

# Über die Dekarboxylierung der organischen Substanz des Bodens

VON DER  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
IN ZÜRICH

ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE EINES  
DOKTORS DER TECHNISCHEN WISSENSCHAFTEN

GENEHMIGTE  
PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON

**Peter Dubach**

von Wahlern (Kt. Bern)

Referent: Herr Prof. Dr. H. Deuel

Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Koblet

---

Zürich 1958

L. Speich, Reproduktionsanstalt, Brandschenkestraße 47/49

Leer - Vide - Empty

**Meinen lieben Eltern**

Leer - Vide - Empty

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	9
2. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE	10
21. Dekarboxylierung der gesamten Humusstoffe	10
211. Literatur	10
212. Versuche	14
213. Diskussion	21
22. Nachweis von Uronsäuren in Humusstoffen	23
221. Literatur	23
222. Versuche	24
2221. Allgemeines	24
2222. Nachweis monomerer Uronsäuren	25
2223. Nachweis gebundener Uronsäuren	29
223. Diskussion	35
23. Nachweis dekarboxylierbarer Humusstoffe nichturon- säureartiger Natur	37
231. Extraktion	38
2311. Literatur	38
2312. Versuche	39
2313. Diskussion	46
232. Fraktionierung	48
2321. Literatur	48
2322. Versuche	49
2323. Diskussion	53
233. Charakterisierung der Humusfraktionen	55
2331. Literatur	55
2332. Versuche	57
2333. Diskussion	69
234. Dekarboxylierbare Gruppen von Humusstoffen	71
2341. Literatur über die Dekarboxylierung organischer Säuren	71
2342. Versuche	72
2343. Diskussion	

	<b>Seite</b>
<b>3. SCHLUSSBETRACHTUNG</b>	<b>75</b>
<b>4. MATERIAL</b>	<b>76</b>
41. Böden	76
42. Modellsubstanzen	76
<b>5. METHODEN</b>	<b>77</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>82</b>
<b>7. LITERATUR</b>	<b>84</b>
<b>8. ANHANG (Formeln)</b>	<b>89</b>

Meinem verehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. H. Deuel,

Vorstand des Agrikulturchemischen Institutes der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, danke ich für die persönliche Anteilnahme und die wissenschaftliche Förderung, die er mir bei der Ausführung dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Leer - Vide - Empty



## 1. EINLEITUNG

Seit 1946 sind aus verschiedenen Böden Polyuronide (uronsäurehaltige Polysaccharide) in geringer Menge isoliert worden (s.S. 23). Polyuronide sollen neben anderen Stoffen massgeblich an der Bildung stabiler Bodenkrümel beteiligt sein (6, 32, 72, 106, 125, 157). Es besteht daher ein praktisches Interesse, den Polyuronidgehalt des Bodens zu bestimmen. Shorey und Martin (144) haben 1930 erstmals "Uronsäuren" im Boden mit der Methode von Lefèvre und Tollens (98) bestimmt. Seither sind viele solche "Uronsäure"-Bestimmungen durchgeführt und in der organischen Substanz des Bodens zum Teil über 40 Prozent "Uronsäuren" gefunden worden.

In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob mit der Methode von Lefèvre und Tollens tatsächlich Uronsäuren bestimmt werden. Dazu wird die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung des Bodens unter Bedingungen geprüft, unter denen Uronsäuren kein oder nur sehr wenig  $\text{CO}_2$  abspalten. Es wird versucht, Uronsäuren papierchromatographisch und durch weitere indirekte Methoden (z.B. Furfurol- und Reduktinsäurebildung) nachzuweisen. Anschliessend werden nichturonsäurehaltige, dekarboxylierbare Humusfraktionen aus dem Boden isoliert, und es wird deren leichte Dekarboxylierbarkeit studiert.

## 2. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

### 21. Dekarboxylierung der gesamten Humusstoffe

#### 211. Literatur

Uronsäuren spalten in siedenden Mineralsäuren annähernd quantitativ  $\text{CO}_2$  ab. Auf dieser Eigenschaft beruht die Methode von Lefèvre und Tollens (98) zur Bestimmung der Uronsäuren: Bestimmung des  $\text{CO}_2$ , das in siedender 12-proz. Salzsäure abgespalten wird. Die saure Dekarboxylierung wird gewöhnlich zur Bestimmung des Uronsäuregehaltes von Stoffgemischen benützt.  $\text{CO}_2$  wird dabei aber auch von anderen Verbindungen abgespalten (s.S. 11, 72); die Methode liefert daher nicht immer richtige Ergebnisse (29, 41, 115).

Die Methode von Lefèvre und Tollens wurde verschiedentlich abgeändert bezüglich Apparatur, Säurekonzentration, Reaktionstemperatur, Reaktionszeit und Art der Bestimmung des abgespaltenen  $\text{CO}_2$  (33, 35, 85, 91, 110, 163). Eine Zusammenfassung darüber findet sich bei Huber (85). Meistens dekarboxyliert man während 4 bis 5 Stunden in 12-proz. Salzsäure am Rückfluss in einem auf 140 - 145°C erhitzten Oelbad.

Erstmals haben Shorey und Martin (144) Bodenproben in dieser Weise dekarboxyliert. Die organische Bodensubstanz spaltete dabei überraschend viel  $\text{CO}_2$  ab. Sie berechneten daraus den "scheinbaren Uronsäurekohlenstoff" (apparent uronic carbon); der Anteil am gesamten organischen Kohlenstoff betrug 5,15 - 9,25 Prozent in organischen Böden und 12,8 - 28,4 Prozent in Mineralböden.

Indessen war noch nicht abgeklärt, ob Uronsäuren im Boden quantitativ dekarboxylieren und ob nicht auch andere Verbindungen des Bodens  $\text{CO}_2$  abspalten.

Fuller (67) hat Pektin allein und gemischt mit Boden dekarboxyliert; die Kinetik der  $\text{CO}_2$ -Abspaltung wurde durch den Boden nicht verändert.

Die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung könnte indessen von Oxydations- oder Reduktionsmitteln quantitativ verändert werden. So spalten Glukose und Zellulose beim Erhitzen in 9-proz. Salzsäure nur sehr wenig  $\text{CO}_2$  ab, in Gegenwart von  $\text{FeCl}_3$  jedoch ist die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung bedeutend (0,65 Mol  $\text{CO}_2$  aus 1 Mol Glukose in 5 Stunden bei Zugabe von 0,5 Mol  $\text{FeCl}_3$  (112,113). Tracey (164) fand jedoch,

dass die Dekarboxylierung eines Pektinpräparates, das 50 Prozent reduzierende Zucker enthält, auch in Gegenwart besonders eisenreicher Bodenproben und bei Zugabe von  $MnO_2$  normal verläuft. Selbst grosse Mengen Reduktionsmittel, wie Zinkstaub,  $SnCl_2$ ,  $FeSO_4$ , setzen die  $CO_2$ -Abspaltung aus Boden und aus Pektin nur wenig herab (Fuller, 67, Norman, 118). Die Autoren schlossen daraus, dass im Boden wohl keine Substanzen vorhanden seien, die die Dekarboxylierung der Uronsäuren merklich beeinflussen.

Fuller (67) hat verschiedene Säuren, die wegen ihrer Struktur eigentlich zur Dekarboxylierung neigen sollten und die im Boden vorgefunden oder vermutet werden (p-Hydroxybenzoesäure, Salizylsäure, Gallussäure, Ellagsäure und ein Gemisch verschiedener Phenolkarbonsäuren aus Rottannenrinde), getestet. Von keiner dieser Säuren liess sich mehr als 0,3 Prozent Kohlenstoff als  $CO_2$  abspalten, während Bodenproben 1 bis 6 Prozent, im Mittel 2,5 Prozent Kohlenstoff abspalten. Fuller (65, 67, 68) glaubte deshalb, dass bei der Dekarboxylierung von Bodenproben die  $CO_2$ -Abspaltung aus nichturonsäureartigen Verbindungen unbedeutend sei.

Norman (115) und namentlich Tracey (163) prüften eine grosse Zahl biologisch wichtiger Verbindungen und fanden nur bei den in Tab. 1 aufgeführten eine  $CO_2$ -Abspaltung, die mehr als 2 Prozent der Einwaage ausmachte.

Tabelle 1

Verbindungen, die in siedender 12-proz. Salzsäure mehr als 2 Prozent  $CO_2$  abspalten

Verbindungen	$CO_2$ -Abspaltung in Prozent der Einwaage	Literatur
Brenztraubensäure	5,4	115
Allantoin	4,0	163
Alloxan	9,0	"
p-Aminobenzoesäure	3,2	"
Askorbinsäure	17-18	"
Hypoxanthin	10,3	"
Harnstoff	27-28	"
<u>zum Vergleich:</u>		
organ. Bodensubstanz im Mittel	4	
Uronsäureanhydrid	25	

Die Uronsäurebestimmung könnte demnach durch Dekarboxylierung anderer Verbindungen gestört werden. Bis jetzt ist aber nicht bekannt, dass solche Verbindungen im Boden in grösseren Mengen vorkommen (139, 169).

Zucker und uronsäurefreie Polysaccharide spalten nur sehr wenig  $\text{CO}_2$  ab (23, 116). In Böden kommen sie nicht in Mengen vor, dass eine wesentliche  $\text{CO}_2$ -Abspaltung aus diesen Stoffen zu befürchten wäre (118).

Die Aehnlichkeit der Kinetik der  $\text{CO}_2$ -Abspaltung von Bodenproben und Pektin hielt Fuller (68) für den besten Beweis dafür, dass die dekarboxylierenden Verbindungen des Bodens tatsächlich Uronsäuren seien. Er stellte zudem fest, dass bei Aenderung der Reaktionsbedingungen (Oelbadtemperatur  $135^\circ - 110^\circ \text{C}$ , Salzsäurekonzentration 14,5 - 7,3%, Zugabe von Reduktionsmitteln) die Kinetik der Dekarboxylierung von Bodenproben und von Pektin in gleicher Weise verändert wird (67).

Fuller (65, 68) verglich die Kinetik der Dekarboxylierung von Bodenproben mit jener von Polyuroniden aus Pflanzen und aus Bakterien, sowie mit jener aus verschieden stark abgebautem Pflanzenmaterial. Stark abgebautes Pflanzenmaterial und Polyuronide aus Bakterienkulturen ergaben die ähnlichste Kinetik; Fuller nahm deshalb für die vermuteten Bodenpolyuronide eine bakterielle Herkunft an.

Nach diesen Versuchen war man überzeugt, dass im Boden keine wesentlichen Mengen nichturonsäureartiger dekarboxylierbarer Verbindungen vorhanden seien (68).

Im folgenden sollen die wichtigsten Ergebnisse der Dekarboxylierung von Bodenproben besprochen werden.

Die Resultate von Shorey und Martin (144) wurden später von verschiedenen Autoren bestätigt (5, 8, 65, 67, 68, 69, 70, 118, 150, 164, 168).

Norman und Bartholomew (118) fanden eine Zunahme des "scheinbaren Uronsäuregehaltes" in der organischen Substanz mit der Profiltiefe. Dies besonders in Podsolen, wo im B-Horizont bis 40 Prozent "scheinbarer Uronsäurekohlenstoff" festgestellt wurde (5).

Fuller (68) fand in den obersten Schichten verschiedener Böden 9 bis 23 Prozent und in den unteren Schichten 19-30 Prozent "scheinbaren Uronsäurekohlenstoff".

Innerhalb den einzelnen Bodentypen ist das Verhältnis des "scheinba-

baren Uronsäurekohlenstoffs" zum gesamten organischen Kohlenstoff erstaunlich konstant und zwar trotz starker Variation im Ton- und Gesamtkohlenstoffgehalt. Das Verhältnis wird auch durch verschiedene Düngungs- und Bepflanzungspraktiken kaum verändert (70).

Wenn Pflanzenmaterial mikrobiologisch abgebaut wird, so werden, ähnlich wie bei Lignin, die "scheinbaren Uronsäuren" relativ angereichert (65, 114, 117, 168).

Nach Springer (150) nimmt der "scheinbare Uronsäuregehalt" auch bei der organischen Bodensubstanz mit dem Zersetzungsgrad zu. Danach ist die Zunahme des "scheinbaren Uronsäurekohlenstoffs" mit der Profiltiefe verständlich (68).

Bei der Dekarboxylierung karbonathaltiger Böden müssen die Karbonate vorgängig zerstört, oder sie müssen gesondert bestimmt werden. Für die Karbonatbestimmung sind folgende Methoden gebräuchlich:

- a) 15 Minuten Sieden in 12-proz. Salzsäure (128)
- b) 1 Stunde Sieden in 1-proz. Salzsäure (144)
- c) 1 Stunde Behandeln mit 5-proz. Salzsäure bei Zimmertemperatur (4)
- d) 1,5 Minuten in 0,5-n. Salzsäure mit 1,4% Fe Cl<sub>2</sub> unter vermindertem Druck Sieden (17).

Indessen spalten auch saure Böden (z.B. Podsolböden), die keine Karbonate enthalten, beim Erhitzen in verdünnten Mineralsäuren (1-proz. HCl) bedeutende Mengen CO<sub>2</sub> ab (4, 5, 144, 168). Die CO<sub>2</sub>-Abspaltung ist nach mehreren Stunden nicht beendet. Bei Behandlung mit 5-proz. Salzsäure bei Zimmertemperatur hört die CO<sub>2</sub>-Abspaltung vor Ablauf einer Stunde auf (5). Diese Erscheinung wurde dahin gedeutet, dass unbekannte Polyuronide schon beim Erhitzen in 1-proz. Salzsäure zu dekarboxylieren beginnen. Tatsächlich fanden Link und Niemann (100) eine gewisse Zerstörung der Uronsäuren beim Sieden mit verdünnten Säuren (2-proz. HCl, 1-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Alvsaker (5) zerstörte deshalb die Karbonate vor der Dekarboxylierung mit 5-proz. Salzsäure bei Zimmertemperatur.

Die Feststellung, dass die organische Bodensubstanz schon beim Sieden in 1-proz. Salzsäure bedeutende Mengen CO<sub>2</sub> abgibt, gab uns die Anregung, Bodenproben unter verschiedenen Bedingungen zu dekarboxylieren. Bis jetzt wurde Boden nur in 12-proz. Salzsäure dekarboxyliert, weil man so nach der

Methode von Lefèvre und Tollens die Uronsäuren bestimmen wollte. Einzig Fuller (67) hat, wie erwähnt, für den Nachweis der Uronsäuren die Reaktions-temperatur sowie die Säurekonzentration etwas geändert. Seine Ergebnisse waren aber, wie unsere weiteren Versuche gezeigt haben, nicht schlüssig.

## 212. Versuche

### 2121. Dekarboxylierung von Boden- und Strohproben\*) mit 12-proz. Salzsäure und Berechnung der "scheinbaren Uronsäuren"

Zum Vergleich mit Literaturangaben wurden die Proben in 12-proz. Salzsäure während vier Stunden bei einer Oelbadtemperatur von 140 bis 145°C dekarboxyliert (s. Methoden, S. 77). Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Die "scheinbaren Uronsäuren" berechnen sich wie folgt:

1 mäß. titrimetrisch bestimmtes CO<sub>2</sub> (= 22 mg CO<sub>2</sub>) entspricht

$$\frac{6 \times 12}{2} = 36 \text{ mg Uronsäurekohlenstoff oder}$$

$$\frac{176}{2} = 88 \text{ mg Uronsäureanhydrid.}$$

Tabelle 2

Dekarboxylierung und "scheinbarer Uronsäuregehalt" von Bodenproben und von frischem und abgebautem Weizenstroh

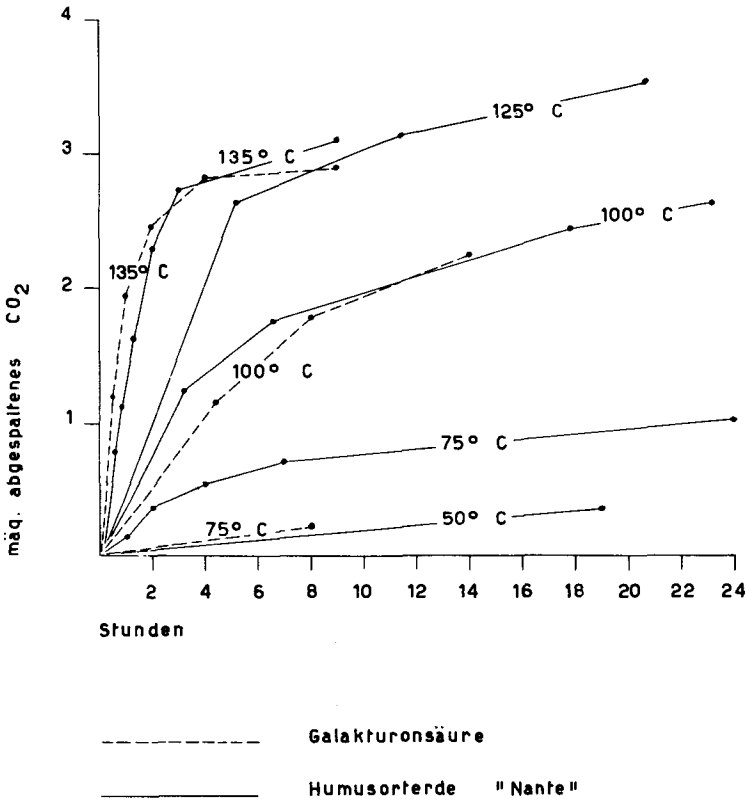
Dekarboxylierung in 12-proz. HCl bei 140-145°C Oelbadtemperatur

Material	Glüh- verlust des lufttrockenen Materials	org. C	CO <sub>2</sub> -Abspaltung	"scheinbares Uron- säureanhydrid" bezogen auf Glüh- verlust	"scheinbarer Uronsäure-C" bezogen auf org. C
	%	%	mäß./g	%	%
Braunerde	8,24	2,8	0,11	11,4	13,9
Humusorte "Nante"	25,27	6,0	0,56	19,45	33,5
Humusorte "Champex"	6,06	1,8	0,17	24,95	34,4
Humusortstein "Champex"	4,55	1,2	0,16	33,8	47,95
*frisches Weizenstroh	94,5	-	0,38	3,6	-
*70 Tage verrottetes Weizenstroh	82,6	-	0,42	4,3	-
*180 Tage verrottetes Weizenstroh	76,5	-	0,72	8,2	-

\*) Die Strohproben wurden von Herrn dipl. ing. agr. U. Schobinger zur Verfügung gestellt.

**2122. Kinetik der Dekarboxylierung der Humusorteerde "Nante" in 12-proz. Salzsäure bei verschiedenen Oelbadtemperaturen**

Wenn die Geschwindigkeit der  $\text{CO}_2$ -Abspaltung aus Bodenproben und uronsäurehaltigem Material bei Aenderung der Reaktionstemperatur gleich verändert wird, so liegt der Schluss nahe, dass die dekarboxylierbaren Verbindungen des Bodens Uronsäuren sind. Die Bodenprobe gab relativ rasch  $\text{CO}_2$  ab.



**Figur 1** : Kinetik der Dekarboxylierung der Humusorteerde "Nante" (5g) und der Galakturonsäure (0,280 g) in 12-proz. Salzsäure (50 cm<sup>3</sup>) bei verschiedenen Oelbadtemperaturen

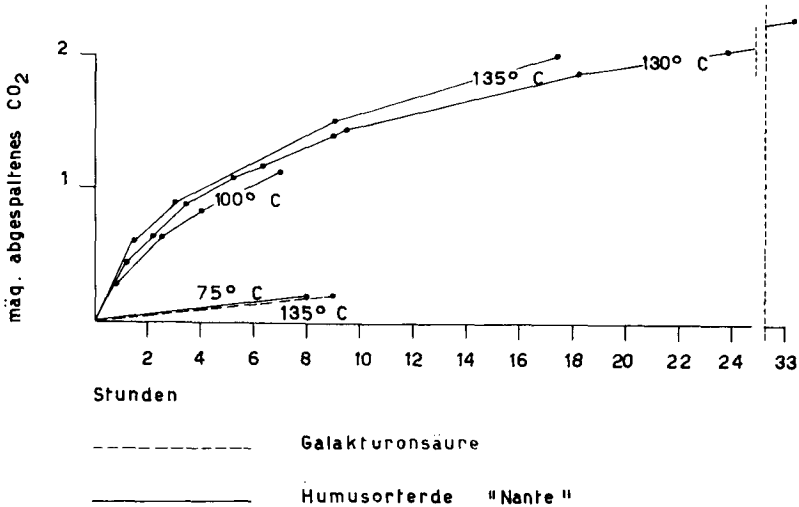
Deshalb wurde als Vergleichssubstanz monomere Galakturonsäure verwendet; denn monomere Uronsäuren dekarboxylieren rascher als polymere und gebundene Uronsäuren, und die Galakturonsäure dekarboxyliert rascher als z.B. Mannuron- oder Glukuronsäure (lakton) (85).

Die Versuche wurden in der Apparatur, die von Zweifel (173) beschrieben wurde, durchgeführt. Die verwendete Menge Galakturonsäure entspricht dem "scheinbaren Uronsäuregehalt", den man beim Dekarboxylieren von 5 g Bodenprobe in 12-proz. Salzsäure in vier Stunden (Oelbadtemperatur 140 - 145°C) erhält.

Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt. Die Geschwindigkeit der CO<sub>2</sub>-Abspaltung hängt sehr stark von der Temperatur ab. Bei 75°C Oelbadtemperatur dekarboxyliert die Bodenprobe bedeutend, während Galakturonsäure bei dieser Temperatur praktisch kein CO<sub>2</sub> abspaltet. Bei höheren Temperaturen (100° und 135°C) ist die Kinetik der CO<sub>2</sub>-Abspaltung der Galakturonsäure ähnlich derjenigen des Bodens, wie bei den Versuchen von Fuller (67).

2123. Kinetik der Dekarboxylierung der Humusorterde "Nante" in Wasser bei verschiedenen Oelbadtemperaturen

Wir suchten Bedingungen, unter welchen die organische Bodensubstanz CO<sub>2</sub> abspaltet und unter welchen die Uronsäuren nicht oder nur wenig zersetzt werden. Es zeigte sich, dass die Humusorterde "Nante" schon beim Erhitzen in Wasser bedeutende Mengen CO<sub>2</sub> abspaltet.



Figur 2: Kinetik der Dekarboxylierung der Humusorterde "Nante" (5 g) und der Galakturonsäure (0,280 g) in Wasser (50 cm<sup>3</sup>) bei verschiedenen Oelbadtemperaturen



Die Versuche wurden bei verschiedener Oelbadtemperatur durchgeführt. Sie sind in Fig. 2 zusammengestellt. Bei 75<sup>o</sup>C wird sehr wenig, bei 100<sup>o</sup>C wird viel CO<sub>2</sub> abgespaltet. Höhere Temperaturen (130<sup>o</sup>C und 135<sup>o</sup>C) (Ueberhitzung des in Wasser unlöslichen Bodenmaterials über die Siedetemperatur des Wassers) steigern die CO<sub>2</sub>-Abspaltung nur wenig. Am Anfang der Reaktion ist die CO<sub>2</sub>-Abspaltung relativ rasch, sie klingt dann ab und hört selbst nach langer Zeit nicht auf (130<sup>o</sup>C während 33 Stunden).

Die Galakturonsäure spaltet in siedendem Wasser (Oelbadtemperatur 135<sup>o</sup>C) praktisch kein CO<sub>2</sub> ab. Das gleiche Ergebnis hat Weber (170) mit Pektin in 1-proz. Lösung erhalten.

Fuller (87) zeigte, dass in einigen schwach sauren bis schwach basischen Böden CO<sub>2</sub> hartnäckig absorbiert sein kann. Werden die Böden aber während 18 Stunden in 12-proz. Salzsäure mit CO<sub>2</sub>-freier Luft belüftet, so wird absorbiertes CO<sub>2</sub> in allen Fällen restlos entfernt (meistens genügt auch eine Stunde Belüftung).

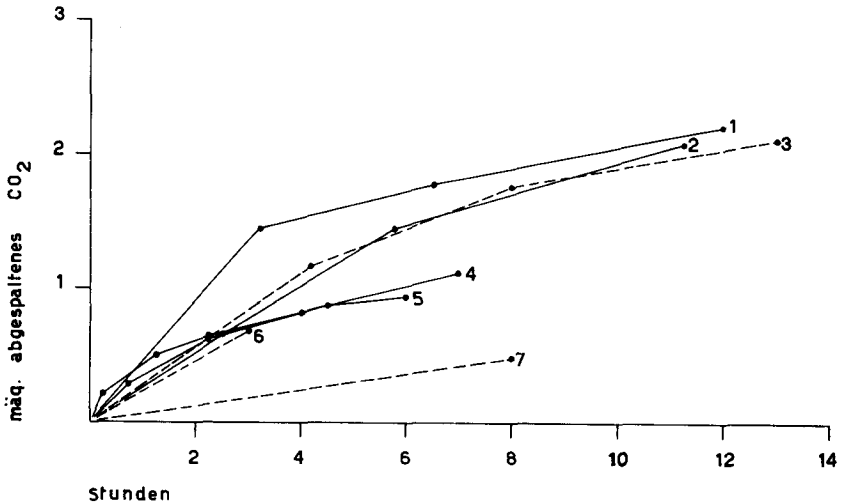
Mit dieser Behandlung wurde aus unseren Böden aber kein CO<sub>2</sub> freigesetzt. Dieselbe Probe wurde anschliessend noch in 12-proz. Salzsäure dekarboxyliert. 5 Gramm Boden entwickelten während 17 1/2 Stunden in Wasser bei 135<sup>o</sup>C 2,02 mäß. CO<sub>2</sub>, nachdem das Reaktionsgemisch vorher während 18 Stunden mit Stickstoff in der Dekarboxylierungsapparatur belüftet worden war. Nach 17 1/2 Stunden wurde abgekühlt, konz. Salzsäure bis zur Konzentration von 12 Prozent zugesetzt und die Dekarboxylierung während 4 Stunden bei 135<sup>o</sup>C fortgesetzt. Es spalteten dabei noch 1,45 mäß. CO<sub>2</sub> ab, während die ursprüngliche Probe, nachdem sie in 12-proz. Salzsäure 18 Stunden mit Stickstoff belüftet worden war, unter gleichen Bedingungen (4 Stunden, 12-proz. Salzsäure, 135<sup>o</sup>C), 2,8 mäß. CO<sub>2</sub> abspaltete (Fig. 1). Bei 18-stündiger Behandlung mit 12-proz. Salzsäure bei Zimmertemperatur wurde überhaupt keine messbare Menge CO<sub>2</sub> freigesetzt. Das in Wasser abgespaltene CO<sub>2</sub> ist deshalb dasselbe wie jenes, das in 12-proz. Salzsäure abgespaltet wird.

#### 2124. Kinetik der Dekarboxylierung der Humusorte "Nante" in verschiedenen Medien bei Oelbadtemperaturen um 100<sup>o</sup>C

Die Dekarboxylierung verläuft in Pyridin praktisch gleich wie in Wasser (Fig. 3). Die CO<sub>2</sub>-Abspaltung in Wasser kann also nicht an das schwach saure Milieu (pH 4,8) gebunden sein. Erstaunlich ist die Aehnlichkeit der Kurven der Dekarboxylierung in 12-proz. und 1-proz. Salzsäure. Von einer re-

lativ niedrigen Säurekonzentration an hängt die Kinetik der  $\text{CO}_2$ -Abspaltung offenbar weniger von der Säurekonzentration als von der Reaktionstemperatur ab.

Galakturonsäure dekarboxyliert in 12-proz. Salzsäure bedeutend langsamer als die Bodenprobe. Besonders deutlich sind diese Unterschiede in 1-proz. Salzsäure.



- |                             |                          |
|-----------------------------|--------------------------|
| 1. 12 - proz. HCl, 100° C   | 5. Pyridin, 105° C       |
| 2. 1 - proz. HCl, 100° C    | 6. 3 - proz. HCl, 135° C |
| 3. 12 - proz. HCl, 100° C   | 7. 1 - proz. HCl, 110° C |
| 4. H <sub>2</sub> O, 100° C |                          |

----- Galakturonsäure  
 \_\_\_\_\_ Humusorte "Nante"

**Figur 3:** Kinetik der Dekarboxylierung der Humusorte "Nante" (5 g) und der Galakturonsäure (0,280 g) in 12-proz., bzw. 1-proz. Salzsäure, Pyridin und Wasser (50 cm<sup>3</sup>) bei Oelbadtemperaturen um 100° C

2125. Dekarboxylierung verschiedener Bodenproben in verschiedenen Medien bei einer Oelbadtemperatur von 110<sup>0</sup> C

Die untersuchten Böden sind alle karbonatfrei. (Bei Behandlung mit 12-proz. Salzsäure in der Dekarboxylierungsapparatur wurden bei Zimmertemperatur in keiner Probe messbare Mengen CO<sub>2</sub> frei.) Trotzdem spalten aber alle in siedendem Wasser CO<sub>2</sub> ab. Das Verhältnis der CO<sub>2</sub>-Abspaltung in 12-proz. Salzsäure, 1-proz. Salzsäure und Wasser ist für alle Böden ungefähr von gleicher Grössenordnung, nämlich ca. 1 : 0,6 : 0,3 (Tab. 3). Für Galakturonsäure ist das Verhältnis 1 : 0,1 : 0,07.

Tabelle 3

Dekarboxylierung von Bodenproben und von Galakturonsäure in 12-proz. bzw. 1-proz. Salzsäure und in Wasser bei 110<sup>0</sup> C Oelbadtemperatur während 4 Stunden

Material	Einwaage g	CO <sub>2</sub> -Abspaltung		
		in 12-proz. HCl mäq./g	in 1-proz. HCl mäq./g	in H <sub>2</sub> O mäq./g
Braunerde	5	0,096	0,060	0,028
Humusorterde "Nante"	5	0,386	0,224	0,182
Humusorterde "Champex"	5	0,122	0,096	0,042
Humusortstein "Champex"	5	0,116	0,080	0,028
Galakturonsäure	0,2	4,15	0,50	0,30

2126. Dekarboxylierung von frischem und abgebautem Weizenstroh mit 12-proz. Salzsäure und 1-proz. Schwefelsäure

Nach Angaben der Literatur (s.o.) nimmt der "scheinbare Uronsäuregehalt" bei der biologischen Zersetzung von Pflanzenmaterial relativ zu. Dies ist schwer verständlich, denn uronsäurehaltige Materialien werden von Mikro-

organismen leicht angegriffen. Deshalb wurde frisches und verrottetes Stroh sowohl mit 12-proz. Salzsäure als auch mit 1-proz. Schwefelsäure dekarboxyliert (Tab. 4). In 1-proz. Schwefelsäure dekarboxyliert Galakturonsäure sehr wenig (ca. 6%). Von den "scheinbaren Uronsäuren" des frischen Strohs dekarboxylieren jedoch in 1-proz. Schwefelsäure 15 Prozent, von denjenigen abgebauter Proben sogar 40,4 und 45,5 Prozent. Es ist erstaunlich, dass die aus einer bestimmten Menge Stroh (relative CO<sub>2</sub>-Abspaltung) durch 1-proz. Schwefelsäure abgespaltene CO<sub>2</sub>-Menge während dem biologischen Abbau zunimmt. In der gleichen Zeit wird die organische Substanz des Strohs indessen von 100 auf 19 Gramm abgebaut.

Tabelle 4

Dekarboxylierung von frischem und abgebautem Weizenstroh und von Galakturonsäure in 12-proz. Salzsäure und in 1-proz. Schwefelsäure bei 140-145°C Oelbadtemperatur während 4 Stunden

Material	org. Substanz, bezogen auf Ausgangsmaterial %	Dekarboxylierung 12% HCl 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> -Abspaltung		relative CO <sub>2</sub> -Abspaltung bezogen auf	
			des Strohs mäq./g	der org. Substanz mäq./g	CO <sub>2</sub> -Abspaltung in 12-proz. HCl %	CO <sub>2</sub> -Abspaltung des Ausgangsmaterials in 12-proz. HCl %
frisches Weizenstroh	100	12% HCl 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,38 0,06	0,41 0,06	100 15,3	100 15,3
70 Tage abgebautes Weizenstroh	47	12% HCl 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,40 0,16	0,49 0,20	100 40,4	56,3 22,9
180 Tage abgebautes Weizenstroh	19	12% HCl 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,72 0,32	0,94 0,42	100 45,5	43,6 21,0
Galakturonsäure		12% HCl 1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		9,60 0,53	100 5,6	

### 213. Diskussion

Die an Bodenproben, frischem und abgebautem Weizenstroh durch Dekarboxylieren in 12-proz. Salzsäure bestimmten "scheinbaren Uronsäuren" (Tab. 2) entsprechen den Angaben der Literatur (66, 67, 68, 168). So ist der "scheinbare Uronsäuregehalt", bezogen auf Glühverlust oder organischen Kohlenstoff, von Braunerde-Proben bedeutend niedriger als von Proben aus den Podsol-B<sub>n</sub>-Horizonten, wo die organische Substanz zu einem Drittel aus "scheinbaren Uronsäuren" besteht. Die organische Substanz des frischen Weizenstrohs enthält bedeutend weniger "scheinbare Uronsäuren". Sie nehmen aber während des Abbaus zu; ihr Anteil an der organischen Substanz verdoppelt sich bei 185-tägigem Abbau.

Es konnte gezeigt werden, dass die organische Bodensubstanz bei niedrigen Oelbadtemperaturen (Fig. 1), in schwach saurem (Fig. 3) und neutralem Milieu (Fig. 2) bedeutende Mengen CO<sub>2</sub> abspaltet. Galakturonsäure dekarboxyliert unter diesen Bedingungen nur sehr wenig (Tab. 3); dabei dekarboxyliert die Galakturonsäure von den bekannten Uronsäureverbindungen, wie erwähnt, am raschesten. Ein grosser Teil des CO<sub>2</sub>, das durch 12-proz. Salzsäure nach der Methode von Lefèvre und Tollens von der organischen Substanz des Bodens abgespalten wird, kann also nicht von Uronsäuren stammen.

Die Uronsäuren lassen sich durch saure Dekarboxylierung nicht trennen von den nichturonsäureartigen dekarboxylierbaren Verbindungen bestimmen. Denn einerseits erreicht die Dekarboxylierung der nichturonsäureartigen Verbindungen in siedendem Wasser (33 Stdn.) oder 1-proz. Salzsäure (10 Stdn.) selbst in langer Zeit keinen Endpunkt, andererseits erreicht die Dekarboxylierung der Uronsäuren in so langer Zeit auch bei diesen Bedingungen schon beträchtliche Werte (Fig. 2 und 3).

Die Bestimmung der Uronsäuren von Boden durch saure Dekarboxylierung nach der Methode von Lefèvre und Tollens ist in letzter Zeit wiederholt kritisiert worden (20, 36, 108, 168). Grund zur Kritik gab vor allem die Tatsache, dass nur sehr kleine Mengen Uronsäuren aus dem Boden isoliert werden konnten, obschon die Dekarboxylierung nach Lefèvre und Tollens zum Teil über 40 Prozent Uronsäurekohlenstoff ergibt. Die Uronsäuren wurden in Form von Polyuroniden mit Äquivalentgewichten um 1000 isoliert (36, 60). Wenn die "scheinbaren Uronsäuren" alle in ähnlichen Polyuroniden gebunden wären, so wäre der Polyuronidgehalt etwa 5 bis 6 mal grösser als der "scheinbare Uronsäuregehalt". Der Polyuronidgehalt wäre so fast ebenso gross oder noch

grösser als der Gehalt an organischer Substanz überhaupt (20, 36, 149).

Uronsäurehaltige Kohlenhydrate von Pflanzen werden durch Bodenmikroorganismen sehr rasch abgebaut (66, 117). Man nimmt deshalb, wie erwähnt, an, dass die Bodenpolyuronide von Mikroorganismen gebildet werden und gegen weitere Zersetzung relativ resistent seien (68). Diese Ansicht wird gestützt durch die Beobachtung, wonach die "scheinbaren Uronsäuren" bei der Zersetzung von Pflanzenmaterial anfänglich sehr rasch abnehmen, dann, bei weiterer starker Zersetzung der organischen Substanz, relativ konstant bleiben und später oft wieder zunehmen (66, 68, 168).

Unsere Versuche mit abgebautem Stroh (Tab. 4) ergaben bezüglich der Dekarboxylierung in 12-proz. Salzsäure die gleichen Resultate. Die mit fortschreitendem Abbau pro Gramm organischer Substanz stark zunehmende  $\text{CO}_2$ -Abspaltung in 1-proz. Schwefelsäure liess uns vermuten, dass durch Dekarboxylierung in 12-proz. Salzsäure in diesen Materialien kaum die Veränderung des Uronsäuregehaltes verfolgt werden kann.

Wie erwähnt, nimmt die absolute  $\text{CO}_2$ -Abspaltung in 1-proz. Schwefelsäure bei sehr starker Abnahme der organischen Substanz für eine bestimmte Menge Ausgangsmaterial sogar leicht zu (Tab. 4). Der Schluss liegt nahe, die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung auf Lignin oder ähnlich resistente Substanzen zurückzuführen.

Tatsächlich fanden Mattson und Koutler-Andersson (108) eine bedeutende Steigerung der  $\text{CO}_2$ -Abspaltung bei autoxydiertem Buchenlignin gegenüber dem ursprünglichen Lignin.

Nach Versuchen von Waksman (168) nimmt die relative Konzentration der "scheinbaren Uronsäuren" im Verlaufe des biologischen Abbaus in ähnlicher Weise wie das Lignin zu.

So wird verständlich, dass der "scheinbare Uronsäuregehalt" mit dem Zersetzungsgrad der organischen Substanz, mit der Tiefe im Profil und durch raubbauähnliche Bewirtschaftung (keine Zufuhr organischer Substanz) relativ zunimmt (70).

Fuller (69) konnte mit verschiedenen Extraktionsmitteln weder im Extrakt noch im Rückstand das Verhältnis des "scheinbaren Uronsäurekohlenstoffes" zum Gesamtkohlenstoff wesentlich verändern. Er schloss daraus auf eine innige Verbindung der Uronsäuren mit der übrigen organischen Substanz. Nach den vorhergehenden Ausführungen kann man daraus schliessen, dass die Dekarboxylierbarkeit eine Eigenschaft der Hauptmasse der organischen Boden-

substanz selbst ist (s. S. 54).

Die leichte  $\text{CO}_2$ -Abspaltung der organischen Bodensubstanz, wie sie in Fig. 2 und 3 zum Ausdruck kommt, ist in anderem Zusammenhang auch von anderen Autoren festgestellt worden (13, 42, 59, 93, 96, 147, 166). Bei der Uronsäurebestimmung an Boden mit der Methode nach Lefèvre und Tollens sind diese Feststellungen aber nicht berücksichtigt worden.

Die Ergebnisse haben bereits eine praktische Bedeutung für die Bodenuntersuchung. Bei der Karbonatbestimmung (Erhitzen in verdünnten Säuren) und bei der Wassergehaltsbestimmung (2 Stunden bei  $105^\circ\text{C}$ ) können bei humusreichen Böden Fehler durch  $\text{CO}_2$ -Abspaltung aus organischen Verbindungen entstehen.

## 22. Nachweis von Uronsäuren in Humusstoffen

Die vorausgegangenen Untersuchungen haben die Fragwürdigkeit der Dekarboxylierungsmethode zur Uronsäurebestimmung an Bodenproben aufgezeigt. Im folgenden soll versucht werden, Uronsäuren im Boden mit anderen Verfahren nachzuweisen.

### 221. Literatur

In neuerer Zeit ist versucht worden, die seit 1930 auf Grund der Dekarboxylierung vermuteten uronsäurehaltigen Verbindungen zu isolieren.

Schreiner und Shorey (139), denen die Isolierung vieler, oft nur in Spuren vorhandener Verbindungen aus den verschiedensten Böden gelang, haben keine Uronsäuren gefunden. Forsyth (58, 60) hat als erster eine Polyuronidfraktion durch selektive Adsorption an Kohle aus der Fulvosäurefraktion verschiedener Böden gewonnen. Im Hydrolysat liess sich chromatographisch Glukuronsäure neben verschiedenen neutralen Zuckern nachweisen. Seither sind Polysaccharide aus den verschiedensten Böden isoliert und teilweise sind auch die Bausteine bestimmt worden (36, 37, 39, 78, 127, 172). Die Bodenpolysaccharide sind nur in sehr kleiner Ausbeute (höchstens 2 Prozent der organischen Bodensubstanz) gewonnen worden; sie enthalten höchstens 20 Prozent Uronsäuren. Sie machen deshalb einen verschwindend kleinen Teil der (durch Dekarboxylieren bestimmten) "scheinbaren Uronsäuren" aus.

Nach direkter Hydrolyse des Bodens ist es gelungen, die gebundenen Aminosäuren qualitativ und sogar quantitativ chromatographisch nachzuweisen (18, 148, 155).

Für glykosidisch gebundene Uronsäuren ist dieses Verfahren schwierig, weil schon bei milder Hydrolyse ein Teil der Uronsäuren dekarboxyliert und vollständige Hydrolyse nur unter ziemlich drastischen Bedingungen erreicht wird (100).

Solche Hydrolysen (2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 7 Stdn.,  $100^\circ\text{C}$ ) sind an den isolierten Boden-Polysaccharidfraktionen zum Nachweis der Zucker- und Uronsäurekomponenten durchgeführt worden (36, 60, 172).

Auf den ganzen Boden ist dieses Verfahren bisher nicht angewandt worden. Einzig Torf (159, 160) und eine bestimmte Humusfraktion (154) sind so auf Uronsäuren und Zucker untersucht worden; dabei sind Uronsäuren in geringer Menge nachgewiesen worden.

Uronsäuren können in biologischen Produkten ausserdem kolorimetrisch, z.B. mit Carbazol nach Dische (34), bestimmt werden. Die direkte Anwendung der kolorimetrischen Uronsäurebestimmung auf Boden ist wohl aussichtslos (164), und an Huminsäurefraktionen ist sie noch nicht geprüft worden. Lynch et al. (104) haben inzwischen die Uronsäuren in der Fulvosäurefraktion kolorimetrisch mit dem von Stark (151) abgeänderten Dische-Verfahren bestimmt und pro 1 g Boden (Dekarboxylierung und Humusgehalt unbekannt) 0,88 bis 1,64 mg Uronsäuren gefunden. Dies würde einer  $\text{CO}_2$ -Abspaltung von maximal 0,016 mäg. pro 1 g Boden entsprechen, was ausserordentlich wenig ist (s. Tab. 2).

## 222. Versuche

### 2221. Allgemeines

Am sichersten werden Uronsäuren durch Isolierung und direkte Identifizierung (einschliesslich Papierchromatographie) nachgewiesen. Bei indirekten Methoden, wie Dekarboxylierung oder Kolorimetrie, besteht die Gefahr, dass andere, gleich reagierende Verbindungen (z.B. neutrale Zucker) mitbestimmt werden.

Wir haben früher versucht, uronsäurehaltige Fraktionen zu isolieren und die Uronsäuren darin zu bestimmen (36). Wie weit die Isolierung quantitativ erfolgte, liess sich nicht abschätzen. Jedenfalls standen die so erfassten Uronsäuren, wie schon bei der Besprechung der Literatur erwähnt wurde, auch nicht angenähert in Beziehung zu den "scheinbaren Uronsäuren" des Bodens.



Die Isolierungsversuche haben gezeigt, dass Uronsäuren in vielen Böden tatsächlich vorkommen. Die uronsäurehaltigen Polysaccharide wurden aber aus intensiv durchwurzelten Bodenschichten gewonnen (36, 58, 127). Aus den sehr stark dekarboxylierenden Podsol-B<sub>h</sub>-Horizonten sind bezeichnenderweise bis jetzt keine solchen Polysaccharide isoliert worden, obwohl sich die organische Substanz besonders leicht und schonend extrahieren lässt (s. S. 43) (133).

Unsere papierchromatographischen Untersuchungen von Hydrolysaten von Bodenproben und Humusextrakten aus Podsol-B<sub>h</sub>-Horizonten liessen keine oder höchstens Spuren von neutralen Zuckerkomponenten erkennen (s. S. 62). In diesen Proben kommen offenbar trotz der starken Dekarboxylierung kaum Polysaccharide vor. Der grösste Teil der Uronsäuren müsste deshalb frei oder in nicht zuckerartigen Verbindungen gebunden vorkommen.

Die "scheinbaren Uronsäuren" können nicht quantitativ extrahiert werden (69) (s. S. 39). Es wurden deshalb Uronsäure-Nachweismethoden gesucht, die direkt auf den Boden angewendet werden können.

Die sechs Uronsäuren (D-Glukuronsäure, 4-0-Methyl-D-Glukuronsäure, D-Galakturonsäure, D-Mannuronsäure, L-Iduronsäure und L-Guluronsäure), welche in Pflanzen vorkommen, sind nicht frei, sondern immer glykosidisch gebunden (11, 51, 82).

Auch aus dem Boden sind keine monomeren Uronsäuren isoliert worden. Ihr Vorhandensein ist dennoch nicht ausgeschlossen. Sie können an Ton und organischen Kolloiden adsorbiert sein und so der Isolierung und dem mikrobiellen Abbau (44, 103, 109, 111) entgehen.

Zuerst sollen deshalb einige Versuche zum Nachweis freier, eventuell adsorbierter monomerer Uronsäuren beschrieben werden.

## 2222. Nachweis monomerer Uronsäuren

### Metallkatalytische Dekarboxylierung

Monomere Uronsäuren dekarboxylieren in Pyridin und Nickelazetat bei einer Temperatur von 100°C (im Reaktionskolben) in 1 Stunde zu 82 Prozent. In Pyridin allein dekarboxyliert Galakturonsäure bei dieser Temperatur in 2 Stunden nur zu 4 Prozent (Zweifel, 173).

Die Braunerde und der Humusortstein "Champex" wurden je in Pyridin

allein und in Pyridin mit Nickelazetat dekarboxyliert (Tab. 5). Schon in Pyridin allein wird etwas CO<sub>2</sub> abgespalten. In Pyridin und Nickelazetat wird in der gleichen Zeit jedoch nicht mehr CO<sub>2</sub> abgespalten.

Es wäre möglich, dass die Dekarboxylierung der an Bodenkolloiden adsorbierten Uronsäuren mit Nickelazetat nicht mehr katalysiert werden kann. Nach früheren Untersuchungen (36) wird Galakturonsäure von Ton stark adsorbiert. Die Bodenproben wurden deshalb mit einer bestimmten Menge Galakturonsäure versetzt, und diese während einer Woche unter Schütteln in Alkohol (Schutz vor mikrobiellem Abbau) adsorbieren gelassen. Dann wurde der Alkohol am Vakuum abdestilliert, und die Proben wurden wieder dekarboxyliert (Tab. 5).

Die Dekarboxylierung der freien und adsorbierten Galakturonsäuren ist praktisch gleich. Dies spricht gegen das Vorhandensein monomerer Uronsäure im Boden.

Tabelle 5

Metallkatalytische Dekarboxylierung von Braunerde und Humusortstein "Champex", von freier und zum Teil adsorbierter Galakturonsäure (Reaktionstemperatur 110<sup>o</sup>C, 2 Stunden)

Material	Einwaage g	CO <sub>2</sub> -Abspaltung	
		in Pyridin (40 cm <sup>3</sup> ) mäq.	in Pyridin (40 cm <sup>3</sup> ) + Nickelazetat (800 mg) mäq.
Braunerde	10	0,20	0,22
Humusortstein "Champex"	10	0,41	0,38
Braunerde und Galakturonsäure (adsorbiert)	10 und 0,1	0,21	0,95
Humusortstein "Champex" und Galakturonsäure (adsorbiert)	10 und 0,1	0,40	1,18
Galakturonsäure	0,1	0,02	0,81

## Chromatographie von Aether-, Wasser- und Säureextrakten

Monomere Uronsäuren und deren Salze sind in Wasser und verdünnter Schwefelsäure löslich. Proben aus Braunerde und dem Humusortstein "Champex" wurden in diesen Medien geschüttelt, um monomere Uronsäuren auf diese Weise zu extrahieren und papierchromatographisch nachzuweisen.

In Aether sind die Uronsäuren schlechter und nur als Säuren löslich. Die Proben wurden deshalb nach Schwartz et al. (139) mit Schwefelsäure angesäuert, mit Silikagel wieder getrocknet und im Soxhlet während 24 Stunden mit Aether extrahiert.

Die Bodenproben wurden mit 50 mg Galakturonsäure pro 10 g Boden (= ca. halbe Menge der "scheinbaren Uronsäuren") versetzt und die Uronsäuren wie oben beschrieben adsorbieren gelassen. Dann wurden daraus ebenfalls Wasser-, Säure- und Aether-Extrakte hergestellt.

Die Aetherextrakte wurden direkt chromatographiert. Die Wasser- und Säureextrakte wurden vorher mit Kationenaustauscher "Dowex 50" entkationisiert, und der Säureextrakt wurde noch mit  $\text{BaCO}_3$  von Schwefelsäure befreit. Papierchromatogramme wurden in Isobuttersäure, Butanol-Aethanol-Wasser (5:1:4) und Eisessig-Aethylacetat-Wasser (2:5:3) (30) laufen gelassen. Als Entwickler diente Anilinphthalat, das mit Uronsäuren und neutralen Zuckern braune bis rote Flecken ergibt. Im Lösungsmittel Butanol-Aethanol-Wasser lassen sich die sauren Zucker von den neutralen Zuckern besonders gut trennen. Die Uronsäuren wandern nur sehr langsam und als stark geschwänzte Flecken, während die neutralen Zucker rascher und als runde Flecken wandern.

Die den Bodenproben zugegebene, zum Teil adsorbierte Galakturonsäure konnte papierchromatographisch in allen Extrakten nachgewiesen werden. Indessen fanden sich in den Extrakten aus den Böden ohne Galakturonsäurezusatz keine Uronsäuren.

Die Extrakte aus dem Humusortstein "Champex" enthielten keine mit Anilinphthalat reagierenden Verbindungen. Die Chromatogramme der Säure- und Wasserextrakte aus Braunerde zeigten in unmittelbarer Nähe des Startpunktes einen schwachbraunen Flecken, der von Polysacchariden herrühren könnte. Es können nicht monomere Uronsäuren sein, weil diese in Isobuttersäure schneller wandern und in Isobuttersäure der fragliche Flecken ebenfalls in der Nähe des Startpunktes erscheint.

### Reduktion mit Natriumborhydrid

Mit Natriumborhydrid können monomere Uronsäuren in einfacher Weise zu den entsprechenden Onsäuren reduziert werden, welche nicht mehr dekarboxylieren. Durch Dekarboxylieren vor und nach der Behandlung mit Natriumborhydrid sollte es möglich sein, aus der Verminderung der CO<sub>2</sub>-Abspaltung auf den Gehalt an monomeren Uronsäuren zu schliessen.

Reine Galakturonsäure konnte in wässriger Lösung bei pH 7,2 quantitativ reduziert werden (keine CO<sub>2</sub>-Abspaltung mehr). In Gegenwart grösserer Salzmengen oder Bodenmaterials verläuft die Reduktion jedoch nicht mehr quantitativ. Die Methode lässt sich deshalb nur auf gereinigte Humusextrakte anwenden. In diesen wird Galakturonsäure quantitativ reduziert (Tab. 6). Die CO<sub>2</sub>-Abspaltung aus den Humusextrakten selbst kann jedoch durch Reduktion mit Natriumborhydrid nicht vermindert werden, was wiederum gegen das Vorhandensein monomerer Uronsäuren spricht (s. S. 72).

Tabelle 6

Dekarboxylierung von Humusextrakten und Galakturonsäure vor und nach der Reduktion mit Natriumborhydrid (12-proz. HCl, Oelbadtemperatur 140°C, 4 Stdn.)

Material	Einwaage g	CO <sub>2</sub> -Abspaltung	
		vor der Reduktion mäq.	nach der Reduktion mäq.
Humusextrakt aus Humusortstein "Champex"	0,2	0,55	0,50
Humusextrakt und Galakturonsäure	0,2 und 0,2	2,55	0,58
Galakturonsäure	0,2	2,00	0,02

2223. Nachweis gebundener Uronsäuren

Chromatographie von Hydrolyse-Extrakten aus Boden

Es wurde versucht, die möglicherweise glycosidisch gebundenen Uronsäuren (s.S. 25) des Bodens durch Hydrolyse abzuspalten und papierchromatographisch nachzuweisen (Tab. 7).

Tabelle 7

**Hydrolysebedingungen zum Nachweis von Uronsäure in der Braunerde  
und im Humusortstein "Champex"**

Säuren	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Oxalsäure	Oxalsäure
Konzentration	2-n.	2-n.	1-n.	1-n.	3-proz.	3-proz.
Temperatur (°C)	100	100	100	100	100	120
Dauer (Stunden)	14	7	14	5	6	40
Druckverhältnisse	im Hydrolysierrohr eingeschlossen				—	4 atü
Literatur	27	60	-	60,154	97	-

Bei Hydrolyse in 2-n. Schwefelsäure werden die glykosidischen Bindungen in 14 Stunden im allgemeinen vollständig gespalten. Allerdings wird dabei ein beträchtlicher Teil der Uronsäuren dekarboxyliert (50, 100). Die glykosidische Bindung der Uronsäuren im Boden könnte indessen labiler sein. Deshalb wurden einige mildere Hydrolysen durchgeführt. In Oxalsäure und unter Druck ist die Gefahr der Zerstörung der Uronsäuren geringer.

Die Hydrolyse-Extrakte wurden mit BaCO<sub>3</sub> bzw. CaCO<sub>3</sub> von Schwefelsäure bzw. Oxalsäure befreit, durch Kationenaustauscher "Dowex 50" perkoliert, anschließend am Vakuum schonend konzentriert und papierchromatographisch untersucht.

In Kontrollversuchen wurde dem Boden vor der Hydrolyse Galakturonsäure in einer Menge, die dem halben "scheinbaren Uronsäuregehalt" entsprach, zugegeben. In diesen Hydrolyse-Extrakten konnte die Galakturonsäure immer einwandfrei nachgewiesen werden.

Die Hydrolyse-Extrakte aus Humusortstein "Champex" enthielten keine Uronsäuren. Bei der Braunerdeprobe konnten nach der Hydrolyse mit 2-n.  $H_2SO_4$  während 14 Stunden bei  $100^{\circ}C$  chromatographisch Spuren von Uronsäuren beobachtet werden. In allen Hydrolyse-Extrakten aus der Braunerde ließen sich papierchromatisch neutrale Zucker erkennen (vor allem Arabinose und Glukose), die nicht näher untersucht wurden. Die Extrakte aus dem Humusortstein "Champex" enthielten keine Zucker (die Chromatogramme zeigten keine Reaktion mit Anilinphtalat). Einzig das mit 2-n.  $H_2SO_4$  während 14 Stunden bei  $100^{\circ}C$  hergestellte Hydrolysat zeigte (bei stark konzentriertem Auftragen der Analysensubstanz) nach dem Entwickeln mit Anilinphtalat unter dem UV einen schwach rötlich- und einen schwach bräunlich-fluoreszierenden Flecken, die wohl auf Spuren von Arabinose und Glukose zurückzuführen sind.

#### Reduktinsäurebestimmung

Nach Reichstein und Oppenauer (126) entsteht aus Pektin bei energiereicher Säurebehandlung Reduktinsäure. Diese Verbindung wirkt stark reduzierend und lässt sich, ähnlich wie Askorbinsäure, mit saurer Jodlösung oder Dichlorphenolindophenol titrieren.

Reduktinsäure enthält man auch aus Galakturon- und Glukuronsäure und wohl aus allen übrigen Hexuronsäuren. In geringer Menge entsteht sie aus D-Xylose und wahrscheinlich auch aus anderen Pentosen. Glukose und Glukonsäure (ebenso Furfurol und Oxymethylfurfurol) geben kaum Reduktinsäure.

Reichstein und Oppenauer erhielten die besten Ausbeuten an Reduktinsäure, wenn sie 300 mg "Tetragalakturonsäure" (Pektinsäure) mit  $5\text{ cm}^3$  5-proz.  $H_2SO_4$  im Hydrolysierrohr während 75 Minuten im Oelbad bei  $150^{\circ}C$  erhitzten.

Bei gleicher Behandlung sollte auch aus den "scheinbaren Uronsäuren" des Bodens Reduktinsäure gebildet werden. Die Reduktinsäure könnte Aufschluss über den wirklichen Uronsäuregehalt geben.

Die Uronsäuren lassen sich aber auf diese Weise nicht direkt im Boden bestimmen. Nach unseren Versuchen wird die Reduktinsäure in Bodenextrakten (extrahiert mit 5-proz. Schwefelsäure) zum Teil oxydiert und lässt sich mit Jodlösung nicht mehr quantitativ titrieren. In entionisierten Humusextrakten wird die Reduktinsäure nicht oxydiert. Die Versuche wurden daher nur mit Humusextrakten ausgeführt, die vorgängig mit Ionenaustauschern entioniert worden waren (Tab. 8).

Dichlorphenolindophenol konnte zur Titration nicht verwendet werden, da Schwefelsäure den Farbstoff zerstört und die Titration in gefärbter Lösung (gelb) ohnehin sehr schwierig ist (75).

Der nicht mit  $H_2SO_4$  behandelte Humusextrakt verbraucht nur eine kleine Menge Jod (Tab. 8) und zeigt einen bleibenden Farbumschlag. Bei der Titration der mit  $H_2SO_4$  behandelten Humusextrakte lässt sich der Umschlagpunkt sehr schwer erkennen. Die blaue Farbe des Stärke-Indikators verschwindet nach dem Umschlag immer wieder. Wir titrierten deshalb mit möglichst gleicher Geschwindigkeit bis zum ersten Umschlag. Neben Reduktinsäure werden möglicherweise auch andere Verbindungen mittitriert, die beim Hydrolysieren der Humusextrakte entstanden sind.

Wenn Galakturonsäure zusammen mit Humusextrakten hydrolysiert wird, so ist der Jodverbrauch etwas geringer, als wenn Galakturonsäure allein hydrolysiert wird.

Der Jodverbrauch der hydrolysierten Humusextrakte entspricht bei weitem nicht dem Wert, der nach der Dekarboxylierung zu erwarten wäre.

Tabelle 8

Dekarboxylierung von Humusextrakten und Galakturonsäure und Jodverbrauch nach der Hydrolyse ("Reduktinsäure"-Bestimmung)

Dekarboxylierung in 12-proz. HCl bei 140-145°C Oelbadtemperatur während 4 Stunden, Jodverbrauch des Filtrates nach Behandlung mit 1-n.  $H_2SO_4$  bei 150°C Oelbadtemperatur während 75 Minuten

Material	Einwaage mg	CO <sub>2</sub> -Abspaltung mäq.	Verbrauch an n/100 Jodlösung cm <sup>3</sup> /100
Galakturonsäure	130	1,30	0,303
Galakturonsäure mit Humusextrakt aus Humusortstein "Champex"	130 und 250	1,30 und 0,65	0,282
Humusextrakt aus Humusortstein "Champex"	500	1,30	0,041
Humusextrakt aus Braunerde	900	1,30	0,108
Humusextrakt aus Humusortstein "Champex", nicht mit $H_2SO_4$ behandelt	500	1,30	0,011

## Furfurolbestimmung

### Allgemeines :

Pentosen und Uronsäuren geben beim Erhitzen in Säuren Furfurol. Bei bekanntem Pentosegehalt kann aus der Furfurolmenge auf den Uronsäuregehalt geschlossen werden.

Ausser Pentosen und Uronsäuren geben auch andere Verbindungen geringe Mengen Furfurol, wahrscheinlich alle Hexosen (40).

Die Furfurolausbeute entspricht weder bei Pentosen noch bei Uronsäuren der Theorie. Uronsäuren geben ca. 34 bis 40 Prozent der theoretischen Furfurolmenge (14, 87, 119, 122).

Schon um die Jahrhundertwende sind Furfurolbestimmungen an Bodenproben gemacht worden, um Pentosen darin nachzuweisen (24, 48, 141).

Shorey und Lathrop (142) haben an 10 verschiedenen Böden Furfurolbestimmungen durchgeführt. Der berechnete Gehalt an Pentosen-Kohlenstoff variierte zwischen 1,3 und 28,53 Prozent, bezogen auf den organischen Kohlenstoff. Shorey und Martin (144) haben die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung und die Furfurolbildung von 11 Böden in 12-proz. Salzsäure untersucht. Für 8 dieser Böden wurde weniger Furfurol nachgewiesen, als allein auf Grund des "scheinbaren Uronsäuregehaltes" zu erwarten wäre. Nur ein Torf- und ein Schlamm Boden (muck-soil) gaben mehr Furfurol, nämlich 57 bzw. 49 Prozent des den "scheinbaren Uronsäuren" entsprechenden theoretischen Wertes. Waksman (168) gibt für die organische Substanz eines Podsol-B-Horizontes bei 32,39 Prozent Uronsäuren (Dekarboxylierung) nur 2,27 Prozent Pentosane (Furfurolbestimmung) an.

Diese Diskrepanz zwischen der Dekarboxylierung und der Furfurolbildung hat auch Alvsaker (5), namentlich in tieferen Horizonten von Podsolen, festgestellt. Nach Acharya (2) wird die Furfurolbildung durch anorganische Verbindungen, besonders dreiwertiges Eisen und vierwertiges Mangan, bedeutend vermindert. Alvsaker glaubte deshalb, dass das Furfurol im Bodenmaterial leicht polymerisierere und die Ausbeuten deshalb so niedrig ausfallen. Shorey und Martin (144) fanden dagegen eine nur unbedeutende Verminderung der Furfurolausbeute aus Pektin, wenn die Bestimmung im Gemisch mit Boden durchgeführt wird.



## Versuche :

Zur Furfurolbestimmung wurde Boden in 12-proz. Salzsäure so erhitzt, dass in 10 Minuten  $30 \text{ cm}^3$  Destillat mit dem gebildeten Furfurol übergangen (136). Nach 2 Stunden konnte im Destillat kein Furfurol mehr nachgewiesen werden (Anilinazetat-Test). Im Destillat wurde das Furfurol mit Phlorogluzin gefällt, und das Phlorogluzid wurde gravimetrisch bestimmt. Multiplikation der Phlorogluzidmenge mit dem empirischen Faktor 0,5185 ergibt die gesuchte Menge Furfurol.

Methylfurfurol aus Methylpentosen, Hydroxymethylfurfurol aus Hexosen und Formaldehyd aus Lignin (63) werden durch Phlorogluzin ebenfalls gefällt. Diese Phlorogluzide lassen sich mit Aethanol (95 %) lösen. Geringe Mengen Furfurol-Phlorogluzid sind in Aethanol ebenfalls löslich. Es wurde auf diese Differenzierung verzichtet; denn fallen die so bestimmten Furfurolwerte kleiner aus, als nach der Dekarboxylierung zu erwarten wäre, so spricht dieses umso deutlicher dafür, dass nicht nur Uronsäuren dekarboxylieren. Später wurden auch einige kolometrische Furfurolbestimmungen mit Orcinol ausgeführt (90).

In Tab. 9 sind die Werte der Furfurolbestimmungen zusammen mit den Ergebnissen der Dekarboxylierung aufgeführt. Bei der Braunerde ist die Furfurolbildung, bezogen auf 1 mÄq. abgespaltetes  $\text{CO}_2$  (12-proz.  $\text{HCl}$ ,  $140^\circ\text{C}$ , 4 Stdn.) grösser als bei der Galakturonsäure. Von den 3 Proben aus den Podsol- $\text{B}_h$ -Horizonten wird bei weitem nicht die Furfurolmenge erhalten, wie sie auf Grund der "scheinbaren Uronsäuren" zu erwarten wäre. Durch Extraktion der Humusorteerde "Nante" mit Komplexon III (Dinatriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure) sind im Rückstand die furfurolliefernden Substanzen gegenüber den dekarboxylierbaren relativ angereichert worden. Das Furfurol- $\text{CO}_2$ -Verhältnis des Humusextraktes und der in 12-proz. Salzsäure löslichen, aschefreien Humusfraktion ist deshalb kleiner als das der Galakturonsäure.

Furfurolbestimmungen an Galakturonsäure allein und gemischt mit Boden unterscheiden sich nur unbedeutend: 180 mg Galakturonsäure geben allein 29 mg Furfurol, im Gemisch mit Boden 26,5 mg Furfurol.

Tabelle 9

**Dekarboxylierung und Furfurolbestimmungen von Böden, Humusextrakten  
und Galakturonsäure**

Dekarboxylierung in 12-proz. HCl bei 140-145°C Oelbadtemperatur wäh-  
rend 4 Stunden

\*) Furfurol = Furfurolphlorogluzid x 0,5185

\*\*\*) Furfurol kolorimetrisch mit Orcinol bestimmt (90)

Material	Einwaage g	Furfurol mg/g	CO <sub>2</sub> -Abspaltung mäq./g	Furfurol
				CO <sub>2</sub> -Abspaltung mg/mäq.
Braunerde	10	2,6*	0,108	24
Humusorтерde "Nante"	10	2,8*	0,560	5,0
Humusorтерde "Champex"	10	0,3**	0,172	1,75
Humusortstein "Champex"	10	0,3**	0,160	1,88
Humusorтерde "Nante", extrahiert mit Komplexon III	10	28,0*	1,67	16,8
Komplexon-III-Extrakt aus Humus- orтерde "Nante"	-	-	-	2,43
Humusfraktion aus Humusortstein "Champex" (löslich in 12-proz. HCl, aschefrei)	0,4	7,5**	2,75	2,7
Galakturonsäure	0,2	145**	8,75	16,6

Kolorimetrische Uronsäurebestimmung

Gereinigte Humusfraktionen, die nach der Hydrolyse papierchromato-  
graphisch keine sauren oder neutralen Zucker erkennen lassen (s. S. 62), spre-  
chen trotzdem auf Zuckernachweis-Reagenzien wie Naphtol, Naphtoresorzin,  
2,3-Dinitrosalizylsäure und Carbazol, an. Für diese Farbteste muss in stark  
basischen oder stark saurem Milieu erhitzt werden. Die Farbe zuckerfreier  
Humusfraktionen wird allein beim Erhitzen in starken Säuren (namentlich  
Schwefelsäure) und Laugen schon störend verändert. Nach diesen Beobachtun-  
gen wurde auf eine genauere Prüfung des kolorimetrischen Nachweises von  
Uronsäuren in Humusstoffen verzichtet.

## 223. Diskussion

Nach den Ergebnissen der metallkatalytischen Dekarboxylierung, der Chromatographie von Extrakten und der Reduktion mit Natriumborhydrid sind im Boden keine monomeren Uronsäuren vorhanden. Monomere Uronsäuren, die beim biologischen Abbau von Pflanzenmaterial eventuell entstehen, werden wohl weiter abgebaut oder aus dem Boden ausgewaschen.

In Polysacchariden gebundene Uronsäuren kommen in vielen Böden, namentlich in intensiv durchwurzelten Bodenschichten, tatsächlich, wenn auch in sehr geringen Mengen, vor (36, 38, 39, 58, 60, 78, 172).

Galakturonsäure, die in der Menge des halben "scheinbaren Uronsäuregehaltes" mit den Bodenproben vor der Hydrolyse vermischt wurde, konnte in allen Fällen chromatographisch nachgewiesen werden. Auch bei energischer Hydrolyse des Bodens mit 2-n.  $H_2SO_4$  während 14 Stunden bei  $100^{\circ}C$  werden die Uronsäuren nicht so stark zerstört, dass sie nicht mehr nachgewiesen werden können.

Die papierchromatographische Untersuchung der Hydrolyse-Extrakte aus dem Humusortstein "Champex" hat keine Uronsäuren und nur Spuren von neutralen Zuckern, vor allem Arabinose, ergeben. Arabinose ist wohl auch die Quelle der geringen Furfurolbildung. Durch Extraktion der Humusorterde "Nante" mit Komplexon III wurden im Bodenrückstand die furfurolliefernden Verbindungen gegenüber den dekarboxylierbaren Verbindungen relativ angereichert. Für Pentosane wäre dies verständlich; denn diese werden von Komplexon III nicht gelöst.

Bei der Braunerde sind Uronsäuren in Spuren; neutrale Zucker, vor allem Arabinose neben Glukose und anderen Zuckern, dagegen sehr deutlich und in viel grösserer Menge, papierchromatographisch festgestellt worden. Die Furfurolausbeute aus der Braunerde ist grösser als die Menge, die dem "scheinbaren Uronsäuregehalt" entspricht. Das Furfurol stammt vermutlich aber zum grössten Teil aus Pentosen; denn die Hydrolysate zeigen in grosser Konzentration Arabinose, aber höchstens Spuren von Uronsäuren.

In Uebereinstimmung mit den Ergebnissen von Shorey und Martin (144) haben unsere Versuche ergeben, dass Uronsäuren im Gemisch mit Boden praktisch die übliche Furfurolausbeute liefern. Entionisierte und in 12-proz. Salzsäure lösliche Humusfraktionen, in denen die Gefahr einer katalysierten Polymerisation des entstehenden Furfurols gering ist, geben ebenfalls nicht die der

Dekarboxylierung entsprechende Furfurolmenge. Es ist daher anzunehmen, dass die niedrige Furfurolausbeute aus gewissen Böden tatsächlich mit niedrigen Gehalten an furfurolliefernden Verbindungen (Pentosen und Uronsäuren) übereinstimmt.

Die Reduktinsäurebildung ist noch nicht zum quantitativen Nachweis von Uronsäuren verwendet worden. Die Ausarbeitung einer solchen Methode dürfte lohnend sein.

Bei unseren Versuchen an Humusextrakten wissen wir nicht, ob die im Boden gebundenen "scheinbaren Uronsäuren" in gleicher Weise wie die monomere Galakturonsäure Reduktinsäure bilden und ob mit der Jodtitration tatsächlich Reduktinsäure erfasst wird. Neben eventuell gebildeter Reduktinsäure sind bestimmt auch andere Verbindungen mittitriert worden (wiederholtes Verschwinden des Umschlagpunktes), andererseits wird aus Galakturonsäure im Gemisch mit Humusextrakt etwas weniger Reduktinsäure gebildet.

Mit Rücksicht auf die anderen Versuche darf die "Reduktinsäure"-Bildung gewissermassen als obere Grenze des wirklichen Uronsäuregehaltes angesehen werden. Danach würde der wirkliche Uronsäuregehalt im Humusextrakt aus dem Humusortstein "Champex" maximal  $1/7$  und im Humusextrakt aus der Braunerde maximal  $1/3$  des "scheinbaren Uronsäuregehaltes" ausmachen.

Uronsäuren in Humusextrakten mit üblichen Methoden kolorimetrisch nachzuweisen, scheint unmöglich; denn die Extrakte sind stark gefärbt und geben, auch wenn sie zuckerfrei sind (papierchromatographisch nach der Hydrolyse), mit den Nachweisreagenzien störende Farbänderungen.

Aus der Gesamtheit der Versuche der beiden vorangehenden Kapitel (die einzelnen Versuche selbst sind nicht unbedingt beweisend) ist der Schluss zu ziehen, dass mit der Methode von Lefèvre und Tollens im Boden nicht nur Uronsäuren bestimmt werden und dass die Uronsäuren, im Gegensatz zur Ansicht von Shorey und Martin (144), nur einen kleinen Teil der organischen Bodensubstanz ausmachen.

### 23. Nachweis dekarboxylierbarer Humusstoffe nichturonsäureartiger Natur

Zur chemischen Untersuchung der organischen Bodensubstanz sind meistens indirekte Methoden angewendet worden. Waksman und Stevens (167) haben das sogenannte "System of proximate chemical analysis" von der Pflanzenchemie auf die Humuschemie übertragen. Nacheinander werden dabei folgende Fraktionen bestimmt :

- Aetherlösliche Fraktion;
- In heissem Alkohol lösliche Fraktion ;
- In heissem Wasser lösliche Fraktion;
- "Hemizellulose"- Fraktion (Hydrolyse mit 2-proz. HCl und Bestimmung der  $\text{Cu}^{++}$ -Reduktion im Filtrat);
- "Zellulose"- Fraktion (Behandlung mit 80-proz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und anschließende Hydrolyse in verdünnter Säure und Bestimmung der  $\text{Cu}^{++}$ -Reduktion im Filtrat);
- "Lignin"- Fraktion (Glühverlust des Hydrolysenrückstandes minus säureunlöslicher Stickstoff x 6,25);
- "Protein"-Komplex (Gesamtstickstoff x 6,25).

Waksman (169) hat viele solche Komplexanalysen mit Literaturangaben zusammengestellt. Diese Ergebnisse sind oft kritisiert worden. Unsere vorerwähnten Untersuchungen haben deutlich die Fragwürdigkeit solcher indirekter Methoden (Dekarboxylierung, Furfurolbestimmung, Kolorimetrie) aufgezeigt.

Zur chemischen Analyse gehören notwendig die Isolierung und die Identifizierung der Verbindungen, wie sie Schreiner und Shorey (137) schon vor fünfzig Jahren begannen. Es stellen sich folgende Probleme :

- Extraktion der organischen Substanz aus dem Boden;
- Entfernung der mitextrahierten anorganischen Verbindungen und des Extraktionsmittels;
- Fraktionierung des organischen Extraktes
- Isolierung und Identifizierung bestimmter Verbindungen.

Alle diese Operationen bieten grosse Schwierigkeiten, da sie ohne chemische Veränderung und ohne Verlust organischer Verbindungen durchgeführt werden sollten. Die meisten Schwierigkeiten sind bis heute noch nicht gelöst.

## 231. Extraktion

### 2311. Literatur

Bremner (22) hat die vielen zur Extraktion der organischen Substanz verwendeten Methoden aus der Literatur zusammengestellt und diskutiert. Die Extraktion, das primäre Problem der Humusuntersuchung, wird nur wenig bearbeitet, obschon man die Mängel der verwendeten Methoden kennt.

Achard (1) hatte erstmals mit Natronlauge Huminsäuren isoliert. Seither ist meistens Natronlauge als Extraktionsmittel verwendet worden. Die alkalische Extraktion wird mit NaOH, KOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in den verschiedensten Konzentrationen, meist 0,5-molar, durchgeführt. Die Extraktionsdauer variiert von Stunden bis Wochen; die Temperatur von Zimmer- bis Siedetemperatur. Oft wird unter Druck und erhöhter Temperatur extrahiert (49, 86, 161).

Durch verdünnte Lauge wird bei Zimmertemperatur in der Regel 60-80 Prozent der organischen Substanz extrahiert. Die restliche "Humin"-Fraktion ist in heisser Lauge oder nach wiederholter Säure-Lauge-Behandlung löslich.

In alkalischer Lösung werden aber die chemischen und physikalischen Eigenschaften vieler organischer Verbindungen verändert. Shorey (143) und Bremner (19) fanden, dass die organische Substanz dabei bedeutende Mengen Sauerstoff aufnimmt und  $\text{CO}_2$  abspaltet. Nach Scheele (130) wird die organische Substanz in alkalischer Lösung in Verbindungen niedrigeren Polymerisationsgrades aufgespalten. Chaminade (25, 26) erhielt bei der Extraktion in Gegenwart von Luftsauerstoff eine umso grössere Ausbeute, je konzentrierter die Lauge und je länger die Extraktionsdauer war. In  $\text{H}_2$ -Atmosphäre ergab die Extraktion nur ein Drittel der Ausbeute, die sich unter Zutritt von Luftsauerstoff ergab. Bremner (19) fand keinen Unterschied zwischen der Extraktion in  $\text{N}_2$ -Atmosphäre und der Extraktion unter Luftzutritt. Er bestätigte aber den Einfluss der Laugekonzentration und der Extraktionsdauer (16).

Um chemische und physikalische Veränderungen möglichst zu vermeiden, wurde die Extraktion unter Luftausschluss ausgeführt (138), und es wurden mildere Extraktionsmittel, wie Neutralsalze, verwendet (16, 77, 147). Am besten eignen sich Alkalisalzlösungen von Säuren, die Kalzium fällen oder damit lösliche Komplexverbindungen eingehen (Fluoride, Pyrophosphate, Zitate, Oxalate). Meistens wird Natriumpyrophosphat verwendet. Diese Salze extrahieren aber bedeutend weniger organische Substanz als Alkalihydroxyde (16).

Nach Hamy und Leroy (77) eignen sich besonders Salze, deren Anionen mit Eisen Komplexverbindungen eingehen (Oxalate, Tartrate, Zitate, Malonate, Salzylate). Das Kation solcher Salze muss Na, K,  $\text{NH}_4$  oder Li sein. Mehrwertige Kationen geben mit der organischen Bodensubstanz unlösliche Verbindungen. Deshalb ist anzunehmen (und es ist auch gezeigt worden (10, 15, 120)), dass solche metallorganische Komplexverbindungen im Boden vorkommen und so der grösste Teil der organischen Bodensubstanz vor der Auswaschung und der Extraktion geschützt wird. Bei der Extraktion der organischen Substanz aus dem Boden werden offenbar die fällenden mehrwertigen Kationen durch stärkere Komplexbildner den organischen Verbindungen des Bodens entrissen. Martin und Reeve (107) haben aus Podsol-B-Horizonten mit Acetylaceton, 8-Hydroxychinolin und N-Nitrosophenylhydroxylamin (Cupferron), also mit lauter guten Schwermetall-Komplexbildnern, zum Teil bis über 90 Prozent des organischen Kohlenstoffs extrahiert.

Schnitzer und Wright (134) haben Podsolproben erfolgreich mit einem Gemisch von 0,5-proz. Salzsäure und 0,5-proz. Fluorwasserstoffsäure (1 : 1) extrahiert.

Mit Wasser und mit gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln (Aether, Alkohol, Benzol, Dioxan, Pyridin) werden nur bescheidene Mengen extrahiert (9, 79, 89, 121, 167, 169). Wenn die organische Substanz aus dem Boden extrahiert und von Salzen befreit ist, so vermögen organische Lösungsmittel dagegen beträchtliche Mengen der organischen Substanz zu lösen (z.B. Hymatomelansäure = in Alkohol löslicher Teil der Huminsäuren (83) ).

Durch partielle Acetylierung bzw. Formylierung lässt sich ein Teil der organischen Substanz beim Kochen mit Acetylbromid (92) bzw. konz. Ameisensäure (162) am Rückfluss extrahieren.

Versuche zur spezifischen Extraktion von dekarboxylierbaren Verbindungen sind ohne Erfolg von Fuller (69) angestellt worden. In den mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaOH,  $\text{NH}_4$ -Oxalat und Acetylbromid gewonnenen Extrakten war das Verhältnis des "scheinbaren Uronsäurekohlenstoffs" zum Gesamtkohlenstoff ungefähr gleich wie im Extraktionsrückstand.

## 2312. Versuche

Nachdem feststand, dass die dekarboxylierbare Substanz des Bodens zum grössten Teil aus nichturonsäureartigen Verbindungen besteht, wurde versucht, solche Verbindungen in reiner Form zu isolieren. Sowohl die Humin-

säurefraktion, die hochmolekulare Verbindungen enthält, als auch die Fulvo-säurefraktion, die vor allem niedermolekulare organische Verbindungen enthält, spalten in siedender 12-proz. Salzsäure  $\text{CO}_2$  ab (152). Je grösser das Molekulargewicht einer Verbindung, desto schwieriger wird die Isolierung und die Strukturaufklärung. Wir entschlossen uns deshalb, nur die niedermolekularen Humusfraktionen zu untersuchen. Wir nahmen vorerst an, dass das  $\text{CO}_2$  von Karboxylgruppen der organischen Substanz abgespalten werde. Unser Ziel war deshalb, möglichst niedermolekulare, dekarboxylierbare Säuren aus dem Boden zu extrahieren.

Die Extraktionsmittel sollten folgende Anforderungen erfüllen:

1) möglichst quantitative Extraktion vor allem der niedermolekularen organischen Säuren, 2) Extraktion unter schonenden Bedingungen (nicht alkalisch, nicht Erhitzen), 3) Möglichkeit der quantitativen Entfernung des Extraktionsmittels ohne Verlust niedermolekularer, extrahierter Säuren. Weiter durfte das Extraktionsmittel selbst nicht dekarboxylieren; denn die Wirksamkeit des Extraktionsmittels wurde anhand der Dekarboxylierung des zentrifugierten oder filtrierten Extraktes in 12-proz. Salzsäure während 4 Stunden bei  $140-145^\circ\text{C}$  Oelbadtemperatur geprüft. Später zeigte sich (s.S. 57), dass die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung aus verschiedenen Humusfraktionen eines bestimmten Bodens stark mit dem C-Gehalt der Humusfraktion korreliert ist. Die Dekarboxylierung eines Humusextraktes gibt deshalb nicht nur Aufschluss über die Extraktion der "scheinbaren Urnsäuren", sondern gleichzeitig auch über die Extraktion der organischen Substanz überhaupt.

Die ersten Extraktionsversuche wurden an der Braunerde durchgeführt (Tab. 10). Anfänglich wurde in Unkenntnis der leichten Dekarboxylierbarkeit (Kap. 21) bei höherer Temperatur während längerer Zeit extrahiert.

Extraktionsmittel mit Hydroxyl- oder Karbonatanionen lassen sich mit Kationenaustauschern leicht und ohne Verlust organischer Säuren entfernen. Deshalb wurde, trotz möglicher chemischer Veränderung, auch die alkalische Extraktion untersucht. Die Dekarboxylierung der Braunerde wird durch 24-stündiges Schütteln in 1-n. Natronlauge in Gegenwart von Luftsauerstoff nicht verändert. Mit 1-n. Natronlauge liessen sich durch einmalige Extraktion bis zu 40 Prozent der dekarboxylierbaren Verbindungen extrahieren. In schwächer alkalischem Milieu (0,5-n. NaOH) ist die Ausbeute kleiner, in  $\text{NH}_4\text{OH}$  und  $\text{NaHCO}_3$  ist sie unbedeutend.

Mit kaltem oder heissem Wasser lassen sich keine dekarboxylierbaren



Verbindungen aus der Braunerde extrahieren.

3-proz. Oxalsäure extrahiert auf dem siedenden Wasserbad (am Rückflusskühler) bis 40 Prozent der dekarboxylierbaren Substanz. Bei der Entfernung der Oxalsäure durch Fällung mit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  wird nicht nur diese, sondern auch fast die gesamte extrahierte organische Substanz aus dem Extrakt ausgefällt. Deshalb wurde die Extraktion mit Ameisensäure verschiedener Konzentration versucht; denn diese kann am Vakuum relativ schonend abdestilliert werden. Mit konz. Ameisensäure konnte nach 10-stündigem Erhitzen auf dem siedenden Wasserbad ebenfalls nur 40 Prozent der dekarboxylierbaren Verbindungen extrahiert werden. 50- bis 12,5-proz. Ameisensäure vermag 25 - 20 Prozent der dekarboxylierbaren Verbindungen zu extrahieren. Da zur Extraktion längeres Erhitzen notwendig ist und dabei schon  $\text{CO}_2$  abgespalten wird, wurde auf die weitere Untersuchung solcher Extrakte verzichtet.

Mit stark konzentrierten Mineralsäuren können durch Schütteln bei Zimmertemperatur aus der Braunerde bedeutende Mengen dekarboxylierbarer Substanz extrahiert werden. Mit 20-proz. Salzsäure (5,4-n.) ist die Extraktion fast doppelt so gross wie mit 40-proz. Schwefelsäure (8-n.). Mit kleineren Konzentrationen ist die Extraktion viel geringer. Durch 24-stündiges Schütteln der Braunerde in 20-proz. Salzsäure und in 80-proz. Schwefelsäure wird kein  $\text{CO}_2$  abgespalten. Das Problem der Entfernung der Salzsäure aus dem 20-proz. Salzsäure-Extrakt konnte nicht gelöst werden (Fällung mit  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  ist zu teuer; Entfernung durch Anionenaustauscher kommt nicht in Frage, weil erstens relativ viel Austauscher benötigt würde und zweitens immer ein Teil der dekarboxylierbaren Verbindungen im Austauscher zurückgehalten wird (s. S. 49)).

Von den geprüften organischen Lösungsmitteln eignen sich Aether, Alkohol und Propylenoxyd nicht zur Extraktion. Die Aetherextraktion (s. S. 27) wurde nach Schwartz et al. (139) durchgeführt. Mit Alkohol wurde während 24 Stunden am Rückflusskühler extrahiert. Durch 1-wöchiges Schütteln der lufttrockenen Bodenproben in Propylenoxyd sollte sich die organische Substanz verestern und anschliessend im überschüssigen Propylenoxyd lösen und extrahieren lassen. Wir glaubten mit Propylenoxyd Erfolg zu haben, weil dieses künstliche Huminsäuren (45) zu lösen vermag.

Wenn niedermolekulare dekarboxylierbare Verbindungen im Boden vorkommen, so sollten diese beim Schütteln mit Anionenaustauschern in Wasser vom Austauscher sorbiert werden und sich so extrahieren lassen.

Tabelle 10

## Extraktion dekarboxylierbarer Humusstoffe aus Braunerde

Dekarboxylierung des Extraktes in 12-proz. HCl bei 140-145°C Oelbadtemperatur  
während 4 Stunden

Extraktionsmittel	Konzentration	Extraktionsbedingungen	CO <sub>2</sub> -Abspaltung des Extraktes bezogen auf CO <sub>2</sub> -Abspaltung des gesamten Bodens %
Natronlauge	0,5-n.	24 Stdn., Zimmertemperatur	25 - 30
"	1,0-n.	24 " "	30 - 40
Ammoniumhydroxyd	0,5-n.	24 " "	5
Natriumbikarbonat	1,0-n.	70 " "	5
Wasser		24 " "	0
"		24 " , 95°C (am Rückflusskühler)	0
Oxalsäure	3-proz.	20 " , Zimmertemperatur	5
"	"	20 Stdn., 100°C (am Rückflusskühler)	40
Ammonoxalat	"	20 Stdn., 100°C (am Rückflusskühler)	25
Ameisensäure	konz.	10 Stdn., 100°C (am Rückflusskühler)	44
"	50-proz.	10 Stdn., 100°C "	25
"	25-proz.	10 Stdn., 100°C "	22
"	12,5-proz.	10 Stdn., 100°C "	22
Salzsäure	20-proz.	24 Stdn., Zimmertemperatur	35 - 40
"	7,5-proz.	24 Stdn., "	15
"	3,6-proz.	24 Stdn., "	10
Schwefelsäure	40-proz.	24 Stdn., Zimmertemperatur	20
"	20-proz.	24 Stdn., "	15
"	4-proz.	24 Stdn., "	8
Aether		24 Stdn., am Soxhlet nach <u>Schwartz et al.</u> (139)	0
Alkohol	90-proz.	24 Stdn., " "	0
Propylenoxyd		1 Woche, Zimmertemperatur	0
"Dowex 2"-OH-Form		1 Woche, Zimmertemperatur	0
"Dowex 2"-OOCH-Form		1 Woche, Zimmertemperatur	0
"Dowex 2"-HCO <sub>3</sub> -Form		1 Woche, Zimmertemperatur	0
Komplexon III		24 Stdn., Zimmertemperatur	20
"		2 g Komplexon III / 10 g Boden	
"		40 Stdn., 60°C	25
"		2 g komplexon III / 10 g Boden	
Acetylaceton		48 Stdn., Zimmertemperatur	0
		20 cm <sup>3</sup> Acetylaceton, 40 cm <sup>3</sup> Aceton und 40 cm <sup>3</sup> Wasser pro 10 g Boden	

Tabelle 11

Extraktion dekarboxylierbarer Humusstoffe aus den Podsol- $B_h$ -Horizonten

**Dekarboxylierung des Extraktes in 12-proz. HCl bei 140-145°C Oelbadtemperatur  
während 4 Stunden**

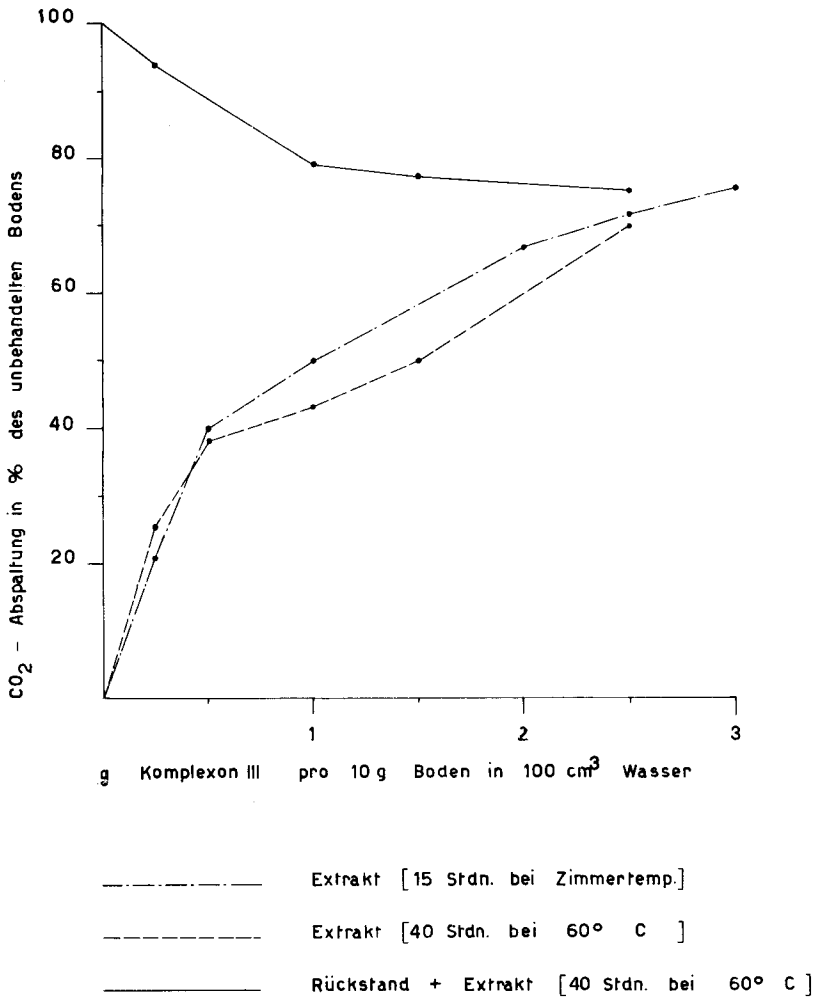
Extraktions- mittel	Boden	Extraktionsbedingungen	CO <sub>2</sub> -Abspaltung des Extraktes bezogen auf CO <sub>2</sub> -Abspaltung des gesamten Bodens
			%
0,5-n.NaOH	Humusortstein "Champex"	24 Stdn., Zimmertemperatur	75
Wasser	"	15 Stdn., 60°C	9
	"	15 Stdn., Zimmertemperatur	7
	Humusorterde "Nante"	15 Stdn., 60°C	3
	"	15 Stdn., Zimmertemperatur	0
3-proz. Sali- cylsäure	Humusortstein "Champex"	20 Stdn., Zimmertemp., 2 g (100 cm <sup>3</sup> Wasser, 10 g Boden)	30
Acetylaceton	"	30 Stdn., Zimmertemp., 20 cm <sup>3</sup> (100 cm <sup>3</sup> Aethanol, 10 g Boden)	50
	Humusorterde "Nante"	30 Stdn., Zimmertemp., 20 cm <sup>3</sup> (100 cm <sup>3</sup> Aceton, 10 g Boden)	45
	"	30 Stdn., Zimmertemp., 20 cm <sup>3</sup> (100 cm <sup>3</sup> Wasser, 10 g Boden)	70
Komplexon III	Humusortstein "Champex"	15 Stdn., Zimmertemp., 2,5 g (100 cm <sup>3</sup> Wasser, 10 g Boden)	72
	"	40 Stdn., 60°C, 2,5 g (100 cm <sup>3</sup> Wasser, 10 g Boden)	72
1-n.HCl	"	15 Stdn., Zimmertemperatur	30
Alkohol	"	15 Stdn., Zimmertemperatur	5 - 10
Aether	"	24 Stdn., am Soxhlet	0 - 5

Wir wählten für diese Versuche den stark basischen Anionenaustauscher "Dowex 2" in der OH-, Formiat- und in der Bikarbonatform. Je 50 g feingemahlene Braunerde wurden während einer Woche mit je 15 cm<sup>3</sup> Wasser geschüttelt. Dann wurde der Austauscher mit einem engmaschigen Sieb vom Boden abgetrennt, sauber mit eisgekühltem Wasser gewaschen und anschliessend dekarboxyliert ("Dowex 2" dekarboxyliert in 12-proz. Salzsäure nicht). Alle Versuche waren negativ; es blieben keine dekarboxylierbaren Verbindungen am Anionenaustauscher haften.

Auf Grund der Publikation von Martin und Reeve (107) über die Extraktion organischer Verbindungen aus Podsol-B-Horizonten mittels organischer Komplexbildner versuchten wir, die Braunerde mit Komplexon III (Dinatriumsalz der Aethylendiamintetraessigsäure) und Acetylaceton zu extrahieren. Der Versuch mit Acetylaceton in wässrig-acetoniger Lösung (Aceton als Lösungsmittel für Acetylaceton und dessen Metallkomplexverbindungen; Wasser als Lösungs- bzw. Dispersionsmittel für die organischen Verbindungen) war erfolglos. Mit Komplexon III konnten jedoch 25 Prozent der dekarboxylierbaren Verbindungen extrahiert werden.

Besser lassen sich die Podsol-B<sub>h</sub>-Proben mit Komplexbildnern extrahieren. Mit Komplexon III und Acetylaceton ist die Extraktion ungefähr gleich wie mit 0,5-n. Natronlauge (Tab. 11). Salizylsäure, ebenfalls ein Komplexbildner, eignet sich auch zur Extraktion. Aus den Podsol-B<sub>h</sub>-Horizonten lassen sich schon mit 1-n. Salzsäure bis zu 30 Prozent der dekarboxylierbaren Substanz extrahieren, während aus Braunerde mit 1-n. Salzsäure praktisch nichts extrahiert wird. Mit Alkohol und Aether lässt sich im Soxhlet nur sehr wenig dekarboxylierbare Substanz extrahieren.

Fig. 4 zeigt, wie die extrahierte Menge dekarboxylierbarer Substanz mit steigender Verwendung vom Komplexon III zunimmt. Bei 15-stündigem Schütteln bei Zimmertemperatur wird gleichviel oder sogar etwas mehr extrahiert als bei 40-stündiger Extraktion bei 60°C. Es findet bei 60°C teilweise schon eine beachtliche CO<sub>2</sub>-Abspaltung, namentlich im nichtextrahierten Rückstand, statt. Zum Erreichen einer grossen Extraktion ist ein sehr grosser Ueberschuss an Komplexon III über die im Boden vorhandene Eisenmenge notwendig. Wird eine 0,25 g Komplexon III enthaltende Lösung mit 10 g Humusortstein "Champex" 15 Stunden lang geschüttelt, so lässt sich im Filtrat davon mit "Tiron" (=Dinatriumsalz der Brenzcatechin-3,5-disulfonsäure) (140) kein freies Eisen nachweisen, d.h. es ist bezüglich Eisen schon ein Ueberschuss an



**Figur 4:** Extraktion dekarboxylierbarer Substanzen aus dem Humus-  
 ortstein "Champex" mit steigenden Mengen Komplexon III  
 bei Zimmertemperatur (15 Stdn.) und bei 60°C (40 Stdn.)

Komplexon III zum Boden gegeben worden, und trotzdem ist damit die optimale Extraktionswirkung noch nicht erreicht (Fig. 4).

Für die weiteren Untersuchungen wurde die dekarboxylierbare Substanz mit Komplexon III aus Podsol- $B_h$ -Horizonten gewonnen. Komplexon III und seine Metallkomplexverbindungen lassen sich beim Perkolieren durch eine Gemischtbett-Ionenaustauschersäule (Anionen- und Kationenaustauscher) quantitativ entfernen (s. S. 50).

Aus den klarzentrifugierten Acetylaceton-Extrakten können das Extraktionsmittel und seine Metallkomplexverbindungen mit Aether (kontinuierliche Extraktion in der Apparatur nach Kutscher und Steudel) extrahiert werden. Die zurückbleibenden Extraktstoffe enthalten noch viel Eisen und sind zum grössten Teil in Wasser unlöslich, im Unterschied zu den durch Anionen- und Kationenaustauscher perkolierten Komplexon-III-Extrakten, die in Wasser vollständig löslich sind.

### 2313. Diskussion

Es ist festzuhalten, dass wir das Problem der Extraktion der organischen Bodensubstanz nicht systematisch zu untersuchen beabsichtigten. Es handelte sich darum, ein Extraktionsmittel zu finden, welches aus einer stark dekarboxylierbaren Bodenprobe die niedermolekularen dekarboxylierbaren Verbindungen ohne chemische Veränderung möglichst quantitativ extrahiert und selbst leicht aus dem Extrakt entfernt werden kann. Für Bodenproben aus Podsol- $B_h$ -Horizonten scheint uns Komplexon III sehr gut geeignet. Wir zogen Komplexon III den von Martin und Reeve (107) verwendeten Komplexbildnern vor, weil Komplexon III und seine Metallkomplexverbindungen sehr gut wasserlöslich sind und Komplexon III mit den mehrwertigen Kationen stabilere Komplexverbindungen eingeht (105). Mit Ionenaustauschern entionisierte Extrakte sind daher praktisch asche- und eisenfrei (Tab. 13) und vollkommen wasserlöslich. Die mit Aether extrahierten Acetylaceton-Extrakte enthalten noch Eisen (und Aluminium (107)) und sind in Wasser nicht vollständig löslich. (Zum Teil können die unlöslichen Verbindungen Huminsäuren sein; diejenigen der Komplexon-III-Extrakte fallen beim Perkolieren durch den Kationenaustauscher aus.) Komplexon III vermag demnach das Eisen besser aus der Bindung mit der organischen Bodensubstanz zu entreissen als Acetylaceton. Bei der Braunerde, wo die Extraktion allgemein schwieriger ist, bewährt sich Komplexon III besser als Acetylaceton.

Die Komplexon-III-Extrakte aus den Podsolproben hatten jeweils ein pH um 4,5. Die Extraktion kann also ohne wesentliche Veränderung der in diesen Böden herrschenden Aziditätsverhältnissen erfolgen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Komplexon III in hoher Konzentration koagulierend auf Ton wirkt (62) und sich die Extrakte so rasch und gut zentrifugieren lassen.

Entionisierte Humusextrakte aus den Podsol- $B_h$ -Horizonten und aus der Braunerde sind in polaren organischen Lösungsmitteln (Methanol, Aethanol, Aceton, Dioxan, Tetrahydrofuran, Pyridin) (s. S. 52) ganz oder zum Teil löslich. Diese Lösungsmittel lösen aber selbst aus dem Boden nur sehr wenig organische Substanz. Entionisierte Humusextrakte geben mit  $FeCl_3$  (und den meisten mehrwertigen Kationen) (s. S. 51) in Wasser und organischen Lösungsmitteln unlösliche Niederschläge. Durch Zugabe von Salzsäure, Natronlauge oder Komplexon III werden die gebildeten Eisenkomplexe leicht zerstört und der Niederschlag wird aufgelöst. Diese Eigenschaften extrahierter Humusstoffe und die Tatsache, dass sich organische Substanz (namentlich aus den Podsolböden, aber auch aus der Braunerde) mit Laugen, Säuren und Komplexbildnern aus dem Boden extrahieren lässt, stützt die Ansicht, dass die organische Substanz im Boden durch komplexe Bindung mit mehrwertigen Kationen ( $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Fe^{+++}$ ,  $Al^{+++}$ ) stabilisiert ist (15, 132).

Die Extraktion der organischen Substanz bedingt demnach eine Zerstörung ihrer Metallkomplexverbindungen. Die verschiedene Extraktion der Braunerde und des Humusortsteins "Champex" mit verdünnter Lauge, verdünnter Mineralsäure und mit Komplexon III zeigt, dass verschiedene Böden und verschiedene Humusfraktionen eines Bodens organische Komplexe verschiedener Stabilität aufweisen. In der Braunerde sind die Komplexe offenbar stabiler, namentlich gegenüber verdünnter Salzsäure (Tab. 10). In der Braunerde machen die Humin-säuren, die in Mineralsäuren unlöslich sind, 50 - 60 Prozent der organischen Substanz aus (95). Demnach wurde mit 20-proz. Salzsäure und durch Erhitzen mit 3-proz. Oxalsäure und konz. Ameisensäure ungefähr der Anteil der Fulvosäurefraktion (40 Prozent) extrahiert (Tab. 10). Deshalb scheint es nicht aussichtslos, auch für diesen Bodentyp eine Methode für eine wirkungsvolle aber schonende Extraktion zu finden: Vorbehandlung der zu extrahierenden Bodenprobe mit einem möglichst starken Komplexbildner und anschließende Extraktion mit neutral- oder schwach alkalisch-reagierenden Alkalisalzen oder mit organischen Lösungsmitteln (Dioxan, Aethylenoxyd, Pyridin).

Das Versagen der Extraktion mit Anionenaustauschern ist verständlich,

wenn die organische Substanz als unlösliche Komplexverbindungen stabilisiert ist. Freie niedermolekulare, dekarboxylierbare Säuren oder lösliche dekarboxylierbare Komplexverbindungen (meistens negativ geladen) kommen in der Braunerde nicht vor.

## 232. Fraktionierung

### 2321. Literatur

Die meisten Humusextrakte (namentlich Lauge-Extrakte) lassen sich mit Mineralsäuren in zwei Hauptfraktionen aufteilen: in die säureunlösliche Huminsäurefraktion, die höhermolekulare und dunkler gefärbte Verbindungen enthält, und in die Fulvosäurefraktion, die die niedermolekularen und heller gefärbten Verbindungen enthält. Die Huminsäurefraktion ist in verschiedene Unterfraktionen (z. B. Grau- und Braunhuminsäuren, Hymatomelansäure) aufgeteilt worden. Ueber die Untersuchung der Huminsäurefraktion gibt es viele Publikationen und einige kritische Zusammenfassungen (22, 55, 89, 145, 161, 169).

Weniger intensiv ist über die Fraktionierung der Fulvosäurefraktion gearbeitet worden. Hock (81) hat Huminsäure- Fulvosäure- und Hymatomelansäure- Lösungen durch Aluminiumoxydsäulen perkoliert und für die verschiedenen Fraktionen verschiedene "Adsorptionschromatogramme" und teilweise unscharfe, gefärbte Zonen erhalten. Hock glaubte damit ein Mittel zur Gewinnung einheitlicher Humusfraktionen gefunden zu haben. Diese Methode ist aber nie dazu verwendet worden. Forsyth (58) hat die Fulvosäurefraktion durch Adsorption an Kohle und selektive Eluierung in vier verschiedene Fraktionen aufgeteilt: Fraktion A (=Perkolat und 0,1-n.HCl-Eluat) enthält einfache organische Verbindungen, wie Aminosäuren, Zucker und die mitextrahierten anorganischen Verbindungen; Fraktion B (=90-proz.-Aceton-Eluat) soll phenolische Glykoside enthalten; Fraktion C (=Wasser-Eluat) enthält uronsäurehaltige Polysaccharide; Fraktion D (= 0,1-n. NaOH-Eluat) gibt positive Pentose-Teste und enthält viel N und P. Die Hauptmasse der organischen Substanz ist in Fraktion D enthalten, die weiter fraktioniert werden müsste. Schlichting (133) hat die organische Substanz von Heidepodsolon auf diese Art fraktioniert und fand dabei keine phenolischen Glykoside in der Fraktion B.

Verschiedene Autoren (19, 55, 154, 161) haben versucht, Humuspräparate papierelektrophoretisch aufzutrennen. Dabei konnten 1 bis 2 Komponenten deutlich verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit und verschiedener



Färbung festgestellt werden. Sie sind aber nicht weiter untersucht worden. Die Schwierigkeiten der papierelektrophoretischen Auftrennung von Humuspräparaten sind folgende: 1) Herstellung vollkommen aschefreier Ausgangspräparate, 2) Auftrennung der an den kolloiden Humusstoffen adsorbierten Verbindungen, 3) Anwendung grösserer Substanzmengen (154). Es ist noch nicht gelungen, Fraktionen in grösserer Menge papierelektrophoretisch abzutrennen.

Ein Teil der Fulvosäurefraktion flockt bei Zugabe von  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  oder  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  aus. Die in Lösung bleibende Fraktion ist heller gefärbt und soll mehr Kohlenstoff enthalten (123).

### 2322. Versuche

Es wurde versucht, die dekarboxylierbare Substanz der Humusextrakte in möglichst asche- und extraktionsmittelfreien Fraktionen anzureichern.

Wenn die dekarboxylierbaren Substanzen aus niedermolekularen Säuren bestehen, so sollten diese an Anionenaustauschern angereichert werden können. Aus der Braunerde und aus dem Humusortstein "Champex" wurden mit 1-n. Natronlauge (kein störendes Anion; keine veränderte Dekarboxylierung) Humusextrakte hergestellt. Durch Perkolation durch Kationenaustauscher "Dowex 50" wurden die Kationen entfernt (in der Austauschersäule fliessen Huminsäuren aus). Das saure (pH 1-2) und dunkelbraun bis schwarz gefärbte Perkolat wurde, nachdem an einem aliquoten Teil die Dekarboxylierung bestimmt worden war, dreimal durch eine lange Anionenaustauschersäule perkoliert, zur Anreicherung der dekarboxylierbaren Verbindungen. Dann wurde mit Wasser nachgewaschen und wiederum an einem aliquoten Teil des Perkolates (pH 1-2) die Dekarboxylierung bestimmt. Als Anionenaustauscher wurde der stark basische "Dowex 2" in der OH-, Formiat- und in der Bikarbonat-Form verwendet. Die Dekarboxylierung war nach der Perkolation durch den Anionenaustauscher jeweils um 10 - 20 Prozent geringer als vor der Perkolation. Die zurückgehaltenen dekarboxylierbaren Verbindungen liessen sich jedoch nicht mehr eluieren, auch nicht mit 0,5-n. NaOH, 0,5-n. HCl oder 2,5-n. Ameisensäure.

Gleiche Ergebnisse wurden bei der Perkolation von Komplexon-III-Extrakten erhalten. Dabei stellten wir fest, dass das überschüssige Komplexon III und sein Eisenkomplex vom Anionenaustauscher quantitativ zurückgehalten wird. (Im Kationenaustauscher fällt der grösste Teil des Komplexon III als

unlösliche Säure aus.) Damit war für die Komplexon-III-Extraktion eine Methode zur Entfernung des Extraktionsmittels und der Kationen, die die Humussubstanzen fällen, gefunden. Es gehen aber 10 - 20 Prozent der dekarboxylierbaren Verbindungen verloren, die gerade die gesuchte niederstmolekulare Fraktion darstellen könnten.

Fraktionierung an Aktivkohle: Nach Forsyth (58) werden 90 Prozent der organischen Substanz der Fulvosäurefraktion beim Perkolieren durch Aktivkohle adsorbiert.

Aus Komplexon-III-Extraktion von Humusortstein "Champex" wurden die Huminsäuren mit Salzsäure gefällt, abfiltriert und das Filtrat wurde durch Adsorptionssäulen aus 1 Teil Celite und 2 Teilen Aktivkohle perkoliert. Dann wurde nacheinander mit 0,1-n. Salzsäure, Aceton, Methanol und Wasser (40<sup>0</sup>C) eluiert. Diese Eluate enthielten keine dekarboxylierbare Substanz, und sie waren farblos bis gelbgrün gefärbt. Die dekarboxylierbare Substanz liess sich mit 0,1-n. Natronlauge nicht quantitativ eluieren. Dieses Eluat war dunkelbraun gefärbt. Die Dekarboxylierung scheint deshalb an die dunkel gefärbten Verbindungen der organischen Substanz gebunden zu sein. Diese Verbindungen hafteten sehr stark an Kohle und konnten nur mit alkalisch reagierenden Lösungen eluiert werden. Diese Methode wurde deshalb aufgegeben.

Fraktionierung durch Dialyse: Komplexon-III-Extrakte aus der Humusortherde "Nante" und dem Humusortstein "Champex" wurden in Cellophanschläuchen und im Elektrodialysator dialysiert. Nach 15 Tagen waren in den Cellophanschläuchen noch 50 - 60 Prozent der dekarboxylierbaren Substanz vorhanden. Im Elektrodialysator dialysierte die Hälfte der dekarboxylierbaren Verbindungen aus der Mittelkammer in die Anodenkammer. Beim Dialysieren fielen in beiden Fällen aus den ursprünglich gut zentrifugierten Extrakten huminsäureähnliche Verbindungen aus.

Fraktionierung durch Fällung in organischen Lösungsmitteln und durch Fällung mit mehrwertigen Kationen: Je nach der Konzentration der Extrakte wurden bis 90 Prozent der dekarboxylierbaren Substanz in Aethanol oder in Aceton (1 Volumen Extrakt, 10 Volumen organisches Lösungsmittel) ausgefällt. War die Ausfällung der dekarboxylierbaren Substanz nahezu vollständig, so war das überstehende Lösungsmittel nur schwach gelblich bis bräunlich gefärbt und enthielt nur wenig gelöste organische Substanz.

Gleiche Resultate wurden durch Fällung mit mehrwertigen Kationen erhalten. Die Ausfällung war bei grösserer Konzentration des Extraktes ebenfalls

grösser, und sie nahm mit den Kationen in nachstehender Reihenfolge zu:  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{+++}$ . Bei genügender Konzentration der Extrakte kann die dekarboxylierbare Substanz mit  $\text{Pb}^{++}$  oder  $\text{Fe}^{+++}$  quantitativ aus Komplexon-III-Extrakten gefällt werden.

Fraktionierung durch verschiedene Fällungsmittel: Salzsäure fällt aus Komplexon-III-Extrakten aus der Humusorterde "Nante" 30 Prozent der dekarboxylierbaren Substanz. Mit Polyimin (Polyäthylenimin) und durch Tannin wird praktisch vollständige Ausfällung erzielt.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Fraktionen für die weitere Untersuchung auf folgende Weise gewonnen:

Fraktionierung der Komplexon-III-Extrakte: Der durch Kationenaustauscher "Dowex-50" in der H-Form und durch Anionenaustauscher "Dowex-2" in der OH-Form perkolierte Extrakt hatte jeweils ein pH zwischen 1 und 2, war eisenfrei und enthielt meistens nur 1 Prozent Asche. Der entionisierte Extrakt wurde stufenweise mit einer konz. Lösung von Bariumhydroxyd neutralisiert, und die schon von pH 2 an ausfallenden Ba-Salze wurden abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Mit "Dowex 50" wurde durch Schütteln und anschließende Perkolation das Barium entfernt, und die Fraktionen gingen in Wasser wieder in Lösung. Dann wurde mit Bariumhydroxyd umgefällt, mit Wasser gewaschen und das Barium wieder mit "Dowex 50" entfernt. Die gut wasserlöslichen, stark sauren Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Dabei wurden sehr voluminöse und gut wasserlösliche Produkte gewonnen. Sie waren stark hygroskopisch und wurden gut verschlossen in Pulverflaschen aufbewahrt. Nach der Neutralisation bis pH 7 wurden die restlichen, löslichen Bariumsalze durch Fällung in Aethanol erhalten.

Die ersten der so gewonnenen Fraktionen waren dunkelbraun, die letzten waren hellgelb. Solche Fraktionen aus einem Komplexon-III-Extrakt aus dem Humusortstein "Champex" sind mit A1 bis A9, solche aus der Humusorterde "Nante" mit B1 bis B9 bezeichnet (s. S. 79). Bei der beschriebenen Methode gehen im Anionenaustauscher dekarboxylierbare Verbindungen, die niedermolekular sein könnten, verloren. Deshalb wurde versucht, eine äthylacetatlösliche und eine ätherlösliche Fraktion zu gewinnen.

Gewinnung der äthylacetatlöslichen Fraktion: Ein Komplexon-III-Extrakt aus dem Humusortstein "Champex" wurde mit "Dowex 50" entkationisiert, anschliessend konzentriert und gefriergetrocknet. Dann wurde 48 Stunden lang im Soxhlet mit Aether extrahiert. Es löste sich nur wenig Substanz im Aether;

diese wurde verworfen. Dann wurde 24 Stunden in Aethylacetat geschüttelt. Dabei löste sich nur wenig Substanz. Es wurde abfiltriert und das verbliebene Extraktpulver in Dioxan geschüttelt, worin es sich erst nach Zusatz von 10 Prozent Wasser löste. Die dunkelbraune Lösung wurde zentrifugiert und das Dioxan am Vakuum abdestilliert. Im Extrakt blieben immer hartnäckig Spuren von Dioxan zurück (79). Dieses wurde durch wiederholtes Auswaschen des Rückstandes mit Aether entfernt. Der Rückstand wurde darauf mit kleinen Portionen von 40<sup>0</sup>C warmem Aethylacetat extrahiert. Es wurde eine rote, klare äthylacetatlösliche Humusfraktion erhalten. Beim Abkühlen der stark konzentrierten Lösung entstand eine gelblich-weiße Flockung, die beim Erwärmen wieder verschwand. Aus der konzentrierten Lösung wurde die Substanz im 10-fachen Volumen Petroläther gefällt, abfiltriert und am Hochvakuum getrocknet, und so wurde ein gelb-oranges Pulver erhalten. Dieses löste sich in Aethylacetat und in Wasser vollständig auf und war stark sauer. Diese Fraktion wurde mit C bezeichnet.

Der unlösliche Rückstand (pulvrig) wurde bei Zimmertemperatur mit Tetrahydrofuran geschüttelt, und aus dem konzentrierten Filtrat wurde im 10-fachen Volumen Aether eine tetrahydrofuranlösliche Fraktion (D) gefällt. Der hellbraune Niederschlag wurde abfiltriert, mit Aether gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Das hellbraune Pulver war ebenfalls löslich in Wasser und stark sauer.

Die Fraktionen C und D enthielten kein Eisen und keine anorganischen Anionen.

Gewinnung der ätherlöslichen Fraktion: Der Humusortstein "Champex" wurde mit 1-n. Salzsäure erschöpfend extrahiert. Der zentrifugierte Salzsäureextrakt (dunkelbraun) wurde im Scheidetrichter mit Aether extrahiert. Die rötlich gefärbte Aetherlösung wurde mit 2-n. Schwefelsäure gewaschen, anschließend mit gesättigter Natriumkarbonat-Lösung extrahiert und diese mit Aether gewaschen. Dann wurde mit 2-n. Schwefelsäure angesäuert und mit Aether extrahiert. Die Aetherlösung wurde mit geglühtem Natriumsulfat getrocknet und die ätherlösliche Substanz (Fraktion E) durch Abdestillieren des Aethers am Vakuum als gelbes Pulver gewonnen. Das Pulver löste sich im Wasser nicht, jedoch in Aethanol, Aceton und Aether und reagierte sauer. In Petrolaether und in Dibutyläther ist die Löslichkeit gering.

Nachstehend sind die Fraktionen A1 bis E zusammengestellt :

- Fraktionen A1 : Durch fraktionierte Fällung eines mit Ionenaustauschern entionisierten Komplexon-III- Extraktes aus Humusortstein "Champex" mit Ba<sup>++</sup> erhaltene Fraktionen.  
bis A9
- Fraktionen B1 : Durch fraktionierte Fällung eines mit Ionenaustauschern entionisierten Komplexon-III- Extraktes aus Humusort-  
bis B9 erde "Nante" mit Ba<sup>++</sup> erhaltene Fraktionen.
- Fraktion C : Aethylacetatlösliche Fraktion eines gefriergetrockneten und entkationisierten Komplexon-III- Extraktes aus Humusortstein "Champex".
- Fraktion D : Tetrahydrofuranlösliche Fraktion eines gefriergetrockneten und entkationisierten Komplexon-III- Extraktes aus Humusortstein "Champex"
- Fraktion E : Aetherlösliche Fraktion eines 1-n. HCl- Extraktes aus Humusortstein "Champex".

### 2323. Diskussion

Die Dialysierversuche haben ergeben, dass sowohl die niedermolekularen als auch die höhermolekularen Verbindungen der organischen Bodensubstanz dekarboxylieren. Die durch Aktivkohle perkolierten Humusextrakte verlieren mit den gefärbten Verbindungen auch die Dekarboxylierbarkeit. Nach Forsyth (58) werden mit Wasser aus den an Kohle adsorbierten Verbindungen die Polyuronide herausgelöst. In unseren Versuchen dekarboxylierten die mit Aceton, Aethanol, Methanol und Wasser (40<sup>0</sup>C) erhaltenen Eluate jedoch nicht, und diese enthielten nur wenig herausgelöste Substanz. Die dekarboxylierbaren Verbindungen hafteten sehr stark an der Kohle; sie waren nur mit alkalischer Lösung eluierbar. Die so erzielten dekarboxylierbaren Fraktionen waren alle, entsprechend der Dekarboxylierung, mehr oder weniger stark gelb bis braun bis schwarz gefärbt.

Aus Humusfraktionen fallen organische Lösungsmittel, wie Aceton und Alkohol und Lösungen mehrwertiger Kationen, je nach den Konzentrationsverhältnissen Fraktionen verschieden dunkler Färbung. In verdünnter Lösung werden hellere (eher höhermolekulare) Fraktionen, in konzentrierter Lösung dunklere (eher niedermolekulare) Fraktionen gefällt. Wegen der starken Konzentrationsabhängigkeit lässt sich diese Fraktionierung nur schwer reproduzieren.

Geringe Verunreinigungen können zudem die Ausfällung stark beeinflussen. Spuren von Bariumchlorid fällen in Wasser dispergierte, schwer zentrifugierbare Bariumhumate sofort aus.

Trotz diesen Nachteilen wurden die sauren Humusstoffe mit Bariumhydroxyd fraktioniert gefällt und so offensichtlich Fraktionen verschiedenen Molekulargewichtes erhalten. Es wäre sehr aufschlussreich, diese Fraktionierung durch Messung der Molekulargewichte zu verfolgen. Es wäre möglich, dass die letzten Fraktionen sich im Molekulargewicht nicht unterscheiden und schon ziemlich einheitlich sind (gleiche Farbe).

Durch Fraktionierung mit verschiedenen Fällungsmitteln ist es nicht gelungen, die organische Substanz in dekarboxylierbare und nicht dekarboxylierbare Fraktionen aufzuteilen. Die Dekarboxylierbarkeit der Fraktionen entsprach dem Gehalt an organischer Substanz.

Humuspräparate, die für die weitere Untersuchung getrocknet werden müssen, sollten, wegen der leichten Zersetzbarkeit beim Erwärmen, unbedingt gefriergetrocknet werden, wie das in unseren Untersuchungen gemacht wurde. Die Humuspräparate lassen sich durch Gefriertrocknung vollständiger von Wasser befreien als auf andere Art. (Aus Huminsäuren lässt sich Wasser bekanntlich nur schwer entfernen (57, 59).) Nach der Gefriertrocknung sind die Humuspräparate stark hygroskopisch, voluminös und behalten ihre ursprünglichen Eigenschaften (im Unterschied zur Trocknung im Vakuumtrockenschrank) unverändert bei.

Bei der Perkolatation von Humusextrakten durch Anionenaustauscher blieb eine gewisse Menge organischer Substanz haften, die sich nicht mehr eluieren liess. Es wäre möglich, dass niedermolekulare Säuren haften blieben. Diese sollten in möglichst polaren Lösungsmitteln, welche noch Stoffe aus den sauren Humusextrakten zu lösen vermögen, löslich sein. Deshalb stellten wir die äthylacetat- und die ätherlöslichen Fraktionen her. Durch Aetherextraktion entkationisierter Komplexon-III-Extrakte ist keine ätherlösliche Fraktion zu gewinnen: entweder vermag Komplexon III diese ätherlöslichen Säuren nicht aus dem Boden zu extrahieren (mit 1-n. Salzsäure konnte eine ätherlösliche Fraktion gewonnen werden), oder die ätherlöslichen Säuren entstehen bei der 1-n. Salzsäure-Extraktion durch Depolymerisierung. Eine ähnliche eigenartige Erscheinung ist die Veränderung der Löslichkeit durch Dioxan: Entkationisierte Komplexon-III-Extrakte sind in Aethylacetat nicht löslich. Wird zuerst in Dioxan gelöst und das Dioxan möglichst gut entfernt, so erhält

man eine beträchtliche, in Aethylacetat lösliche Fraktion.

Austauscher eignen sich gut zur Entfernung der Extraktionsmittel und zur Erzielung relativ aschearmer Humuspräparate. Im Kationenaustauscher fällt ein Teil der Huminsäuren aus und verhindert so das Perkolieren der Extrakte. Deshalb müssen stark huminsäurehaltige Extrakte mit dem Kationenaustauscher geschüttelt werden (ausgefallene Huminsäuren können durch Flotieren gewonnen werden). Es ist unter Umständen wichtig, zu beachten, dass im Kationenaustauscher Eiweiße und im Anionenaustauscher niedermolekulare Säuren und deren Metallkomplexverbindungen (oder durch allgemeine Adsorption auch höhermolekulare Verbindungen) zurückgehalten werden können.

### 233. Charakterisierung der Humusfraktionen

#### 2331. Literatur

**Dekarboxylierung:** Nach Sowden et al. (149) variierte das Verhältnis des "scheinbaren Uronsäurekohlenstoffs" zum Gesamtkohlenstoff in verschiedenen Humusfraktionen von 8,5 bis 18,4 Prozent. Bei verschiedenen Fraktionen des gleichen Bodens ist das Verhältnis jedoch nur wenig verschieden.

**Elementarzusammensetzung:** In der Literatur finden sich wenige Angaben über die Elementarzusammensetzungen von Fraktionen der Fulvosäurefraktion. Ponomareva (123) fand für elektrodialysierte Fulvosäuren verschiedener Böden folgende durchschnittliche Werte: C 44,5%; H 5,6%; O 48,7%; N 1,2%. Huminsäuren sind kohlenstoffreicher (52 - 62%), wasserstoffärmer (2 - 5%), sauerstoffärmer (32 - 40%) und stickstoffreicher (2 - 4%) als Fulvosäuren (55, 129). Die analysierten Präparate waren oft sehr aschereich (über 10%).

**Titrationen:** Nach Ponomareva (123) beträgt das Äquivalentgewicht elektrodialysierter Fulvosäuren durchschnittlich 160. Huminsäuren geben bei der elektrometrischen Titration keine deutlichen Wendepunkte; man bekommt keinen Anhaltspunkt zur Berechnung des genauen Äquivalentgewichtes (161).

**Nachweis von Stoffklassen:** In der organischen Substanz des Bodens (hauptsächlich in der Fulvosäurefraktion) sind Verbindungen der verschiedensten Stoffklassen (Säuren, Aldehyde, Kohlenhydrate, Glykoside, Proteine, Aminosäuren, Amine, Amide, Purine, Pyridin, Pyrimidinderivate, Nukleinsäuren, Paraffine, Sterine, Fette, Wachse, ligninähnliche Verbindungen) nachgewiesen wor-

den (s. Waksman (169)). Tyurin (165) erhielt nach Hydrolyse eines Fulvosäurepräparates mit 5-n. Schwefelsäure 20 - 25 Prozent reduzierende Zucker. Aus der Furfurolausbeute und der Dekarboxylierung schloss er auf 5 - 10 Prozent Pentosane und 15 - 20 Prozent Uronsäureanhydrid.

Aus der Fulvosäurefraktion sind auch die geringen Mengen der früher erwähnten, uronsäurehaltigen Polysaccharidfraktionen gewonnen worden (s.S. 23). Forsyth (58) glaubte in seiner B-Fraktion phenolische Glykoside gefunden zu haben. Schlichting (133) hat dies nicht bestätigen können. Bremner (21) fand 20 - 30 Prozent des Stickstoffes der Fulvosäurefraktion in Eiweissen vorliegend. Er hat die Aminosäurezusammensetzung dieses Eiweissmaterials untersucht. Die Fulvosäurefraktion enthält Inositphosphate und Nukleinsäurederivate. Eine bedeutende Menge des Stickstoffs muss in Nukleinsäuren oder Nukleotiden gebunden sein (s. Bremner, 20).

Funktionelle Gruppen und Bausteine von Huminsäure- und Fulvosäurepräparaten:

Säurenatur (Karboxyl- und saure OH-Gruppen): Auf Grund von Reaktionen kann anscheinend nicht entschieden werden, ob die Säurenatur der Huminsäuren sauren Hydroxyl- oder Karboxylgruppen zuzuschreiben ist. 2,5-Dihydroxychinon ist zum Beispiel eine stärkere Säure als Essigsäure. Deshalb ist durch Verätherung bzw. Veresterung und partielle Verseifung von Huminsäuren (welche chinoide Bauelemente enthalten sollen) keine Unterscheidung saurer Hydroxyl- und Karboxylgruppen möglich (54). Mit Dinitrofluorbenzol lassen sich die sauren Hydroxylgruppen ebenfalls nicht eindeutig erfassen, da mit zunehmender Säurestärke der Hydroxylgruppen (2,5-Dihydroxychinon) der entstandene Aether in wässriger Lösung zersetzt wird oder sich überhaupt keine Aether bilden (55). Huminsäuren reagieren nicht oder nur in sehr geringem Masse mit Dinitrofluorbenzol. Die Anwesenheit saurer OH-Gruppen ist damit aber nicht ausgeschlossen.

In Präparaten der Fulvosäurefraktion konnte nicht mit Sicherheit auf einfache Phenole geschlossen werden (133). Phenolische Grundkörper sind verschiedentlich beim Abbau von Huminsäuren isoliert worden (s. Flaig, 56).

Nach Schobinger (135) lassen IR-Spektren von Huminsäuren aus verrottem Weizenstroh auf Karboxyl- und assoziierte Hydroxylgruppen schliessen.

Karbonyl- und Chinongruppen: Huminsäuren wurden mit Hydroxylamin und mit Phenylhydrazin umgesetzt. Aus der Zunahme des Stickstoffs in den



Reaktionsprodukten liess sich der Karbonylgehalt ausrechnen. Das Aequivalentgewicht für eine Karbonylgruppe betrug 1000, was mit dem hypothetischen chinoiden Bau der Huminsäuren schlecht im Einklang steht. Die Chinone reagieren mit diesen Reagenzien sehr verschieden, und es ergeben sich auch hier keine eindeutigen Resultate (55).

Auf chinoide Gruppen in Huminsäuren deutet die Stickstoffentwicklung bei der Behandlung mit Phenylhydrazinkarbamat und die Entstehung von Maleinsäureanhydrid bei der Behandlung mit Chlordioxyd (s. Flaig, 56).

### 2332. Versuche

Dekarboxylierung: Die Humusfraktionen A1 bis A9 (Humusortstein "Champex"), die sich äusserlich in der Farbe unterscheiden, wurden 48 Stunden am Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet (Gewichtskonstanz) und hernach in 12-proz. Salzsäure dekarboxyliert. In Tab. 12 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung pro Gramm der verschiedenen Fraktionen ist nur wenig verschieden. Sie ist bei verschiedenen Fraktionen pro Gramm Kohlenstoff ziemlich konstant; bei höherem Kohlenstoffgehalt der Fraktionen ist sie etwas geringer.

Tabelle 12

Dekarboxylierung und Kohlenstoffgehalt der Humusfraktionen A1 bis A9 des Humusortsteins "Champex"

Dekarboxylierung in 12-proz. HCl, 7 Stdn., 140-145°C Ölbadtemp. (Einwaage 100 mg)  
C-Bestimmung durch A. Bernhardt, Mikroanalytisches Laboratorium  
im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim-Ruhr

Humusfraktion	$\text{CO}_2$ -Abspaltung mäq./g	C-Gehalt g/g	$\text{CO}_2$ -Abspaltung	"Uronsäure-C"
			$\frac{\text{C-Gehalt}}{\text{mäq./g}}$	$\frac{\text{C-Gehalt}}{\text{g/g}}$
A1	3,32	0,524	6,35	0,228
A2	3,24	-	-	-
A3	3,99	0,506	7,89	0,284
A4	4,10	-	-	-
A5	4,23	0,494	8,55	0,308
A6	4,10	-	-	-
A7	4,15	0,484	8,54	0,309
A8	3,90	-	-	-
A9	3,61	0,492	7,35	0,265

Die Fraktionen A1 bis A4 waren in 12-proz. Salzsäure in steigendem Masse, aber nicht vollständig löslich. Die Fraktionen A5 bis A9 waren in 12-proz. Salzsäure vollständig löslich. Während der Dekarboxylierung bildete sich bei allen Fraktionen ein huminsäureähnlicher Niederschlag (dunkelbraun, löslich in stark verdünnter Lauge und fällbar in Säure).

Während der Dekarboxylierung destillierte kein Furfurol in die vorgeschaltete Waschflasche mit Phlorogluzin-Salzsäure, und die Reaktionslösung gab mit Anilinacetat einen negativen Furfuroltest.

Die Humusfraktionen A1 bis A9 spalteten in siedendem Wasser (klare Lösungen) ebenfalls CO<sub>2</sub> ab. Es bildete sich dabei auch ein Niederschlag, dieser war aber heller und fiel in geringerer Menge an.

Elementarzusammensetzung: In Tab. 13 ist die Elementarzusammensetzung der Humusfraktionen A1 bis A9, B8 und C angegeben. Der Kohlenstoffgehalt der A-Fraktionen nimmt mit dem Aufhellen der Farbe ab, der Sauerstoffgehalt nimmt entsprechend zu. (Fraktion A9 fällt aus der Reihe: Alkoholfällung der bei pH7 wasserlöslichen Bariumhumate.) Die Stickstoffgehalte sind allgemein sehr niedrig. Die Fraktion C (äthylacetatlöslich) ist praktisch stickstofffrei. Die leicht schwankenden Stickstoffwerte lassen auf Verunreinigung schliessen (Spuren von Komplexon III ?).

Tabelle 13

Elementarzusammensetzung, Asche- und Methoxygehalt der Humusfraktionen A1 bis A9 (Humusortstein "Champex"), B8 (Humusorterde "Nante") und C (Äthylacetatlösliches aus Humusortstein "Champex")

Die Analysen wurden ausgeführt von A. Bernhardt, Mikroanalytisches Laboratorium im Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim - Ruhr

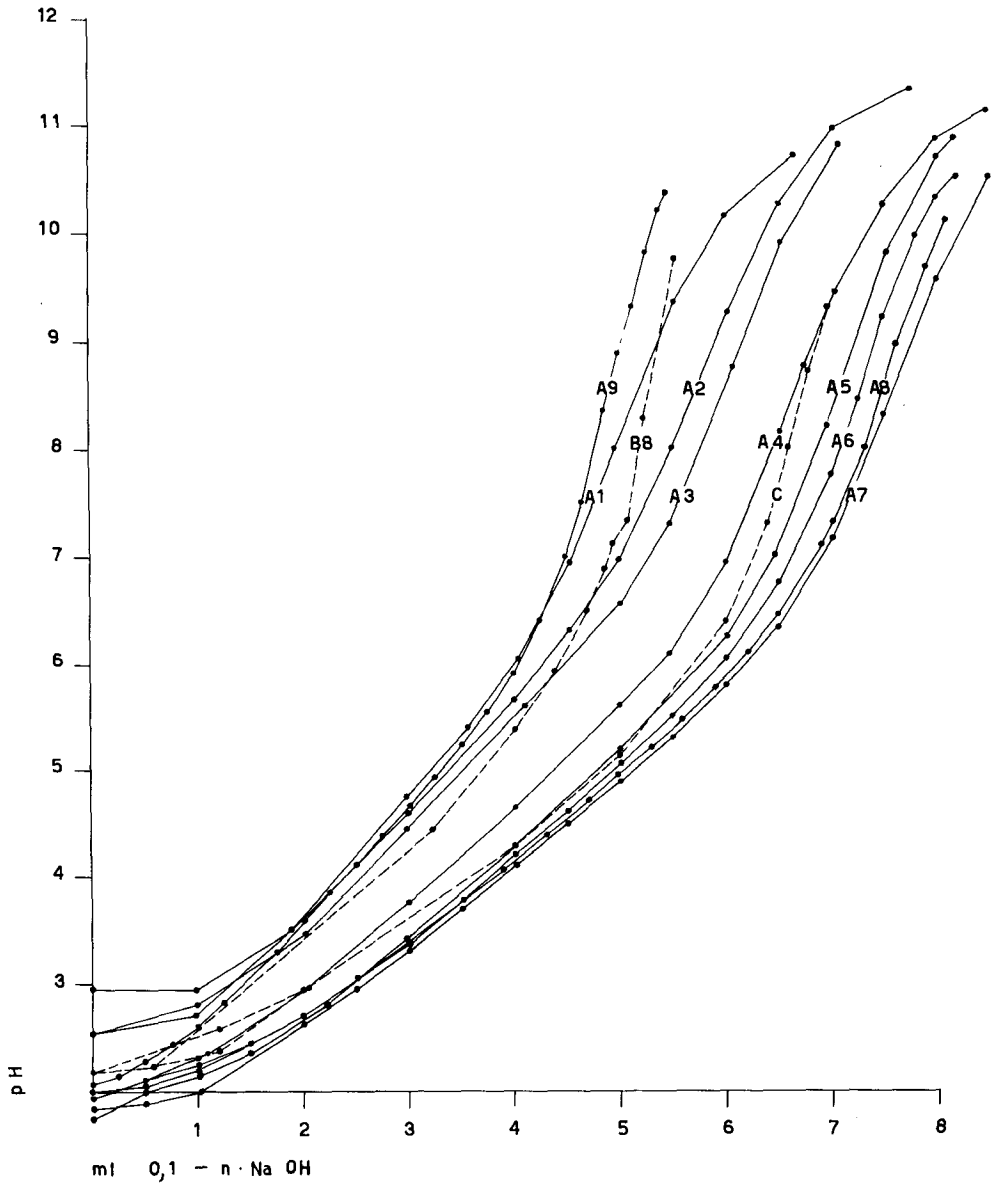
Humusfraktion	C %	H %	O %	N %	Asche %	Summe %	OCH <sub>3</sub> %
A1	52,42	3,68	40,36	0,95	3,07	100,48	1,42
A3	50,63	3,21	44,74	0,59	2,16	101,33	0,67
A5	49,41	3,39	47,34	0,18	0,27	100,59	0,85
A7	48,41	3,52	46,37	0,51	0,76	99,57	0,48
A9	49,25	4,36	45,15	0,99	0,97	100,72	0,77
B8	48,67	4,24	-	0,92	1,58	100,00	-
C	47,27	4,32	46,63	0,09	2,00	100,31	2,83

Titrationen: Je 100 mg der am Hochvakuum während 48 Stunden bei Zimmertemperatur getrockneten Fraktionen A1 bis A9, B8 und C wurden in 20 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und unter Stickstoffatmosphäre mit der Glaselektrode elektrometrisch titriert (0,1-n. NaOH). Die Titrationen (Fig. 5) zeigen keine deutlichen Wendepunkte. Der Kurvenverlauf ist Ausdruck des polybasischen Charakters der sauren Humusfraktionen.

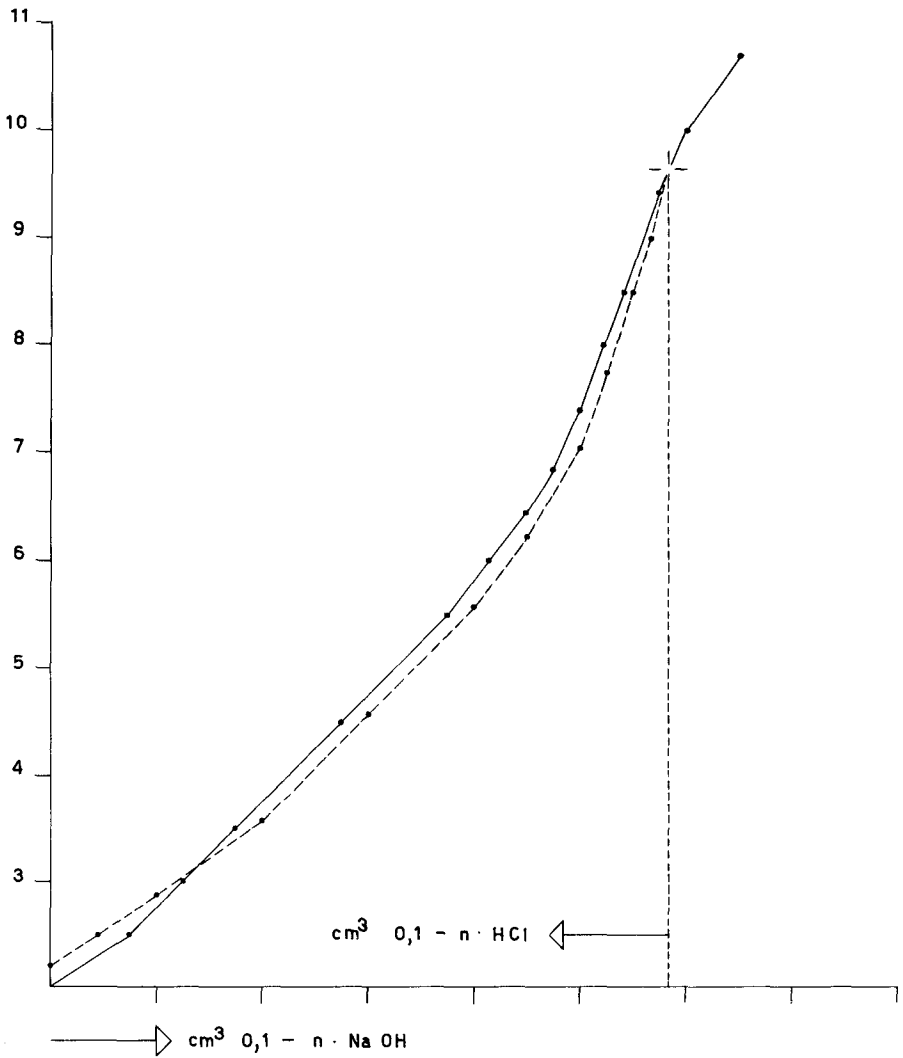
Bei der Titration stellte sich das Gleichgewicht sofort ein. Wurde mit 0,1-n. Natronlauge bis pH 10,7 titriert und die Lösung bei 40°C 4 Stunden unter Stickstoffatmosphäre stehen gelassen, so sank das pH auf 9,7. Nach weiteren 4 Stunden war das pH nicht weiter gesunken. Die Rücktitration mit 0,1-n. Salzsäure ergab den gleichen Kurvenverlauf (Fig. 6). Es lagen demnach keine grösseren Mengen leicht verseifbarer Estergruppen vor.

Die Humuspräparate enthielten keine anorganischen Anionen (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>).

Nimmt man die Wendestelle der Titrationen bei pH 8,5 an, so variieren die Äquivalentgewichte zwischen 204 (A9) und 132 (A8). Sie nehmen mit zunehmender Farbaufhellung (kleinerem Molekulargewicht) und abnehmendem Kohlenstoffgehalt ab (Fraktion A9 bildet eine Ausnahme).



**Figur 5:** Elektrometrische Titration der Humusfraktionen A1 bis A9 (Humusortstein "Champex"), B8 (Humusorterde "Nante") und C (Aethylacetatlösliches aus Humusortstein "Champex") mit 0,1-n. Natronlauge (100 mg Substanz in 20 cm<sup>3</sup> Wasser)



**Figur 6:** Elektrometrische Titration der Humusfraktion C (Aethylacetat-lösliches aus Humusortstein "Champex") mit 0,1-n. Natronlauge und Rücktitration nach 4-stündigem Stehenlassen bei 40°C (unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre) mit 0,1-n. Salzsäure (100 mg Substanz in 20 cm<sup>3</sup> Wasser)

### Nachweis von Stoffklassen:

Kohlenhydrate: Sämtliche Humusfraktionen der Podsolproben gaben mit  $\alpha$ -Naphthol beim Unterschichten mit konz. Schwefelsäure einen blauroten Ring; Kohlenhydrate gaben einen violetten Ring. Fehlingsche Lösung wurde vor und nach der Hydrolyse reduziert. Die Furfurolbildung war unbedeutend (s. S. 34) (höchstens 3 mg pro 300 mg der Fraktionen A1 und A7). Die chromatographische Untersuchung der unhydrolysierten und hydrolysierten Humusfraktionen (2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 14 Stdn., im Hydrolysierrohr bei  $100^\circ\text{C}$ ) ergab keine Zucker.

Eiweisse: Wegen dem sehr niedrigen Stickstoffgehalt wurde nicht versucht, Eiweisse nachzuweisen. (Diese würden im Kationenaustauscher zurückgehalten.)

Einfache Phenole: Die Nachweisreaktionen (47) für einfache Phenole sind an sämtlichen Humusfraktionen negativ ausgefallen. Der Eisenchlorid-Test ergab einen uncharakteristischen, rotbraunen Niederschlag (andere mehrwertige Kationen gaben braune Niederschläge). Mit Millons-Reagens ( $\text{HgNO}_3$  in  $\text{HNO}_2$ ) gaben die Fraktionen gelbbraune Fällung, diese war aber in  $\text{HNO}_3$  nicht rot. Die Reaktion nach Liebermann (mit  $\text{HNO}_2$ -haltiger konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gab schwarze Verfärbung, die aber auch mit reiner konz. Schwefelsäure eintrat. In verschiedenen Lösungsmitteln hergestellte Papierchromatogramme (s. S. 68) wurden ergebnislos mit Phenolreagenzien (diazotierte Sulfanilsäure,  $\text{FeCl}_3$ -Lösung (30)) besprüht.

Funktionelle Gruppen und Strukturelemente: Da keine einheitlichen Verbindungen vorlagen und offensichtlich Schwierigkeiten bei der Ausführung gewöhnlicher Gruppenreaktionen an Humusfraktionen bestehen (s. S. 56) (55), wurden diese orientierenden Analysen nur qualitativ durchgeführt. Von einigen Humuspräparaten wurden IR- (Fig. 7 bis Fig. 11) und UV-Spektren aufgenommen.

UV-Spektren: Von den Fraktionen A8, C, B8 (1-promillige Lösungen der Fraktionen in Dioxan und in Wasser) wurden die UV-Absorptionskurven aufgenommen. Die Absorption ist sehr gross und nimmt gegen das Gebiet kleinerer Wellenlängen zu, ohne je ein Maximum zu erreichen. Es lässt sich daher mit dieser Methode nichts über den Chemismus der vorliegenden Verbindungen aussagen. Natürliche und künstliche Huminsäuren ergeben gleiche UV-Absorptionskurven (55, 131).

Säurenatur: Die Humusfraktionen sind alle stark sauer und haben Äquivalentgewichte von 204 bis 132.

Die Fraktion B4 wurde in Methanol gelöst, mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan versetzt und 24 Stunden bei 0°C stehen gelassen. Durch die Diazomethanbehandlung stieg der OCH<sub>3</sub>-Gehalt (als CH<sub>3</sub> berechnet) von 0,94 auf 12,82 Prozent. Aus der Methoxylzunahme berechnet sich ein Äquivalentgewicht von 112. Titrimetrisch wurde ein Äquivalentgewicht von 170 bestimmt (Wendestelle bei pH 8,5 angenommen). Mit Diazomethan reagieren also mehr Gruppen als durch die Titration mit Lauge erfasst werden. Diazomethan hat offenbar auch mit nicht sauren Hydroxylgruppen reagiert.

Durch die Behandlung mit Diazomethan hellen die Humusfraktionen stark auf und werden in Wasser unlöslich. In Methanol sind alle veresterten Proben löslich und zeigen neutrale Reaktion. Die Fraktionen mit kleinerem Molekulargewicht werden durch die Veresterung auch löslich in Chloroform.

Auf Grund chemischer Reaktionen ist es nicht möglich, genau zwischen sauren Hydroxyl- und Karboxylgruppen zu unterscheiden. Deshalb wurden IR-Spektren\* von folgenden Präparaten aufgenommen:

- Fraktionen C als freie Säure, in KBr aufgenommen (Fig. 7);
- Fraktion C mit Diazomethan in Methanol behandelt, in KBr aufgenommen (Fig. 8);
- Fraktion C mit Diazomethan in Methanol behandelt, in Chloroform aufgenommen (Fig. 9).

Für das Vorhandensein von Karboxylgruppen spricht die schwache und breite Absorption bei 2500 - 2700 K\*\* (12) (Absorption der OH-Funktion von Karboxylgruppen) (Fig. 7). Durch Verestern mit Diazomethan verschwindet diese breite Absorptionsbande (Fig. 8 und 9). Für Karboxylgruppen spricht auch die Verschiebung von 1725 K (Fig. 7) nach 1740 K (Fig. 8 und 9) sowie die Abnahme der Absorptionsintensität in der Gegend von 3400 - 3600 K durch Verestern (Fig. 7, 8 und 9).

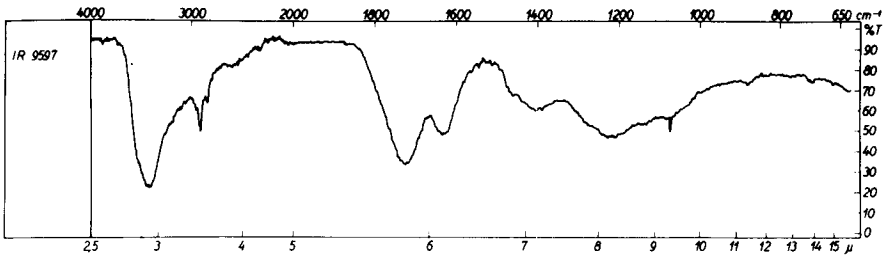
Die nach dem Verestern bestehende, aber abgeschwächte Absorption im Bereich von 3400 - 3600 K (Fig. 7, 8 und 9) deutet auf das Vorhandensein von mit Diazomethan nicht verätherbare Hydroxylgruppen.

Das Vorhandensein aromatischer Strukturen ist sehr fraglich. Die IR-

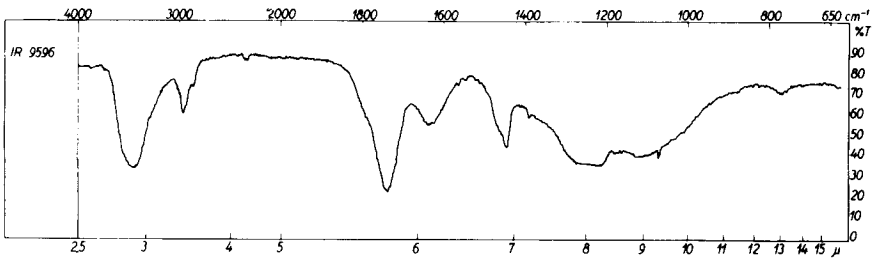
---

\*) Die IR-Spektren wurden im organisch-chemischen Institut der ETH Zürich aufgenommen. Herrn Dr. B. Engel danke ich bestens für die Interpretation der IR-Spektren.

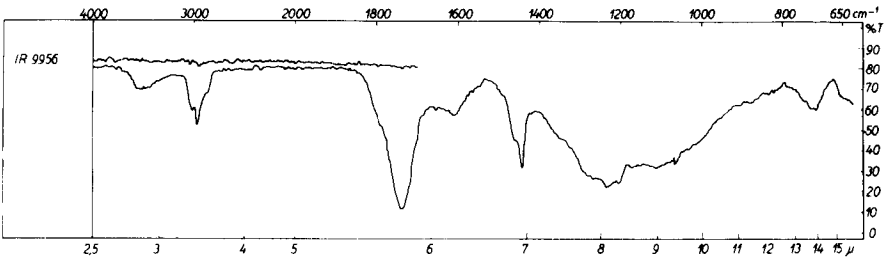
\*\*\*) K = cm<sup>-1</sup>



**Figur 7:** IR-Spektrum der unbehandelten Humusfraktion C (Aethylacetat-lösliches aus Humusortstein "Champex") in Kaliumbromid



**Figur 8:** IR-Spektrum der mit Diazomethan behandelten Humusfraktion C (Aethylacetatlösliches aus Humusortstein "Champex") in Kaliumbromid



**Figur 9:** IR-Spektrum der mit Diazomethan behandelten Humusfraktion C (Aethylacetatlösliches aus Humusortstein "Champex") in Chloroform



Spektren enthalten in dem für aromatische Verbindungen charakteristischen Spektralbereich von 1500 - 1600 K keine deutlichen Absorptionsbanden. Aromatische Verbindungen haben, je nach Substitution, im Bereich von 650-1000 K starke Absorptionsbanden. Es ist zweifelhaft, ob die breiten Absorptionsbanden schwacher Intensität bei 880 und 720 - 730 K (Fig. 7), bei 770 K (Fig. 8) und 720 - 750 K (Fig. 9) auf aromatische Strukturen zurückzuführen sind.

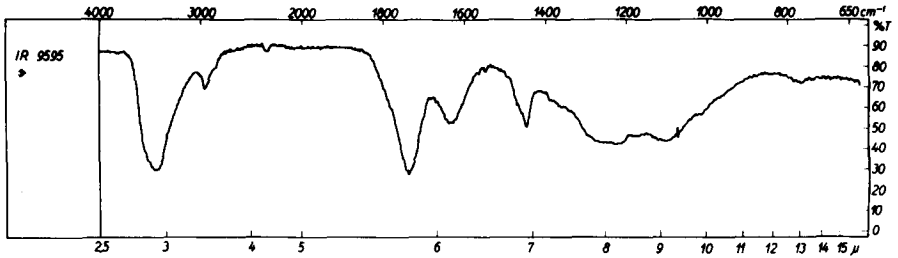
Bei Phenylglykosiden (171) und Ligninen (64, 94, 135, 153) kommen die Aromatenbanden im Bereich von 650 - 1000 K deutlicher zum Vorschein.

Karbonyl- und Chinongruppen: Alle Fraktionen reduzierten Fehling'sche Lösung und alkalisches Silbernitrat. Mit Dinitrophenylhydrazin wurden in salzsaurer Lösung Niederschläge erhalten. Beim Behandeln mit Diazomethan nahm in den Fraktionen der Stickstoffgehalt durchschnittlich um 1 Prozent zu. 1,4-Chinone und  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Aldehyde und Ketone werden von Diazomethan an der Doppelbindung angegriffen und gehen in Pyrazolinderivate über (76). In den Humusfraktionen würde demnach auf eine Molekulargröße von ca. 2800 eine 1,4-chinoide- oder eine  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Karbonylgruppe entfallen.

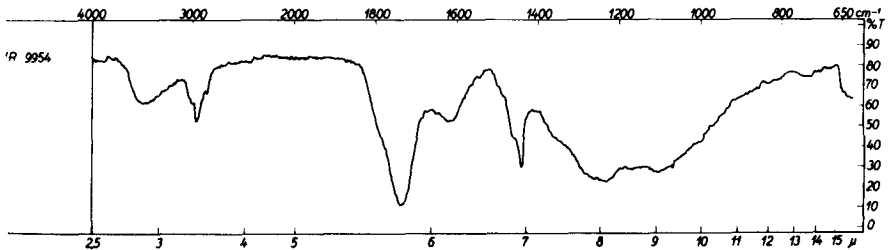
Wegen den Carbonylfunktionen der Carboxylgruppen können die IR-Spektren infolge der schlechten Auflösung nicht zur Erkennung von Carbonylgruppen herangezogen werden.

Wenn die Huminsäuren und deren niedermolekulare Vorstufen chinoide Gruppen in beträchtlicher Zahl enthalten würden, so sollte nach Reduktion der chinoiden Gruppen in den IR-Spektren eine deutliche Zunahme der Absorptionsbanden aromatischer Verbindungen eintreten. Nach Lindberg und Paju (102) lassen sich Chinone einfach mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Phenolen reduzieren. Die Fraktion C wurde deshalb bei pH 7,2 mit Natriumborhydrid reduziert, mit Diazomethan verestert und die IR-Absorptionskurve in KBr und Chloroform aufgenommen (Fig. 10 und 11). (Vor dem Verestern wurde die natriumborhydrid-haltige Lösung durch Kationenaustauscher "Dowex 50" perkoliert. Die im Präparat vorhandene Borsäure liess sich dann mit Diazomethan ebenfalls verestern und am Vakuum leicht entfernen. So wurde ein aschefreies, reduziertes und verestertes Humuspräparat erhalten.) Im Absorptionsbereich der aromatischen Verbindungen wurde aber, gegenüber den nicht reduzierten Präparaten, keine intensivere Absorption festgestellt. Das reduzierte und veresterte Präparat (Fig. 11) ergibt gegenüber dem veresterten Präparat (Fig. 9) (Aufnahmen in Chloroform) eine stärkere Hydroxyl-

Absorptionsbande in der Gegend von 3400 - 3600 K. Das dürfte heissen, dass durch die Reduktion von Aldehyden und Ketonen die unverätherbaren Hydroxylgruppen zugenommen haben. Ein Teil der ätherlöslichen Fraktion E wurde in Aether mit Lithiumaluminiumhydrid (aktiveres Reduktionsmittel) reduziert (146). Die IR-Spektren, die hier nicht aufgeführt werden, ergaben das gleiche Resultat.



**Figur 10:** IR-Spektrum der mit Natriumborhydrid reduzierten und mit Diazomethan behandelten Humusfraktion C (Aethylacetatlösliches aus Humusortstein "Champex") in Kaliumbromid



**Figur 11:** IR-Spektrum der mit Natriumborhydrid reduzierten und mit Diazomethan behandelten Humusfraktion C (Aethylacetatlösliches aus Humusortstein "Champex") in Chloroform

Es ist kaum anzunehmen, dass in den vorliegenden Fraktionen grössere Mengen chinoider Gruppen vorhanden sind.

Kohlenstoffdoppelbindungen: Die Fraktion A5 wurde in Methanol gelöst und mit einer methanolischen Lösung von Brom versetzt (84, 101). Je nach der Reaktionszeit war die Bromaufnahme verschieden, und das daraus berechnete Aequivalentgewicht für eine Kohlenstoffdoppelbindung variierte zwischen 1200 (30 Minuten) und 500 (24 Stunden). Bei polymeren Verbindungen und bei Anwesenheit elektronenziehender Gruppen (z. B. OH-, COOH-Gruppen) ist die Anlagerung von Brom an die Doppelbindung erschwert (84). Unter gleichen Bedingungen waren diese Bromierungsversuche gut reproduzierbar. Ueber die Anzahl der Doppelbindungen sagen sie aber, wegen der starken Abhängigkeit von der Reaktionszeit, wenig aus. Da die Humussubstanz leicht oxydierbar ist, könnte Brom mit anderen Gruppen reagiert haben.

Die Fraktion A5 wurde mit Platinoxid bei Zimmertemperatur in H<sub>2</sub>-Atmosphäre bei leichtem Ueberdruck (max. 20 cm Hg) hydriert. Der Wasserstoffgehalt stieg dabei von 3,39 auf 4,02 Prozent. Danach würde eine Doppelbindung auf ein Aequivalentgewicht von 315 entfallen. Nach der Hydrierung (keine weitere Wasserstoff-Aufnahme nach 26 Stunden) war der Bromverbrauch um ein Drittel kleiner (24-stündige Bromierung). Die Frage steht offen, ob dabei die organische Substanz oxydiert wurde oder ob noch unhydrierte Kohlenstoffdoppelbindungen bromiert wurden.

Die Wasserstoffaufnahme war zu Beginn der Hydrierung stürmisch (ca. 10 cm<sup>3</sup> für 100 mg Fraktion A5), dann wurde über 26 Stunden nur noch langsam Wasserstoff aufgenommen. Dies und der verminderte Bromverbrauch sowie der höhere Wasserstoffgehalt nach der Hydrierung sprechen für die Anwesenheit von Kohlenstoffdoppelbindungen.

#### Versuche zur Isolierung reiner Verbindungen aus den Humusfraktionen:

Es ist nicht gelungen, reine Verbindungen aus den Fraktionen zu isolieren. Im folgenden sollen kurz die angewandten Methoden und die dabei beobachteten Schwierigkeiten erwähnt werden.

Fraktionierte Kristallisation: Die klaren konzentrierten Lösungen der Fraktionen C (äthylacetatlöslich) und E (ätherlöslich in Aethylacetat bzw. Aether trübten sich beim Abkühlen und bildeten nach einiger Zeit einen Niederschlag. Dieser löste sich bei leichtem Erwärmen auf. Durch geringen Zusatz polarer Lösungsmittel (Petroläther, Dibutyläther, Aether) trat diese Erscheinung verstärkt auf. Es wurden verschiedene "Umkristallisierungen" vorgenommen. Unter dem Polarisationsmikroskop liessen sich aber nie Kristalle erkennen, sondern nur amorphe, gleichförmige Körnchen. Wenn mit grösseren

Mengen gearbeitet würde, könnte die Reinheit dieser vielleicht reinen, aber nicht kristallisierbaren Stoffe mit anderen Kriterien geprüft werden.

Die Fraktionen sind allgemein sehr reaktionsfähig. Von klarfiltrierten, ätherlöslichen Fraktionen wurde verschiedentlich beobachtet, dass sie sich, nach vollständiger Entfernung des Aethers am Vakuum, in Aether nicht mehr restlos lösten.

Chromatographie : Bei der Chromatographie der Humusfraktionen störten die ausgeprägten hydrophilen Eigenschaften (bei der Verteilungschromatographie) und die starke Adsorptionsfähigkeit (bei der Adsorptionchromatographie). Die Wanderung der Humusstoffe konnte in den Chromatogrammen auf einfache Weise an der Eigenfarbe bei Tageslicht oder an der Fluoreszenz im UV-Licht verfolgt werden.

Papierchromatographie : Die Fraktionen B6 und B8 liessen sich am besten aufsteigend mit wassermischbaren organischen Lösungsmitteln chromatographieren. Für die Fraktion B8 war 60-proz. wässriges Propanol am besten geeignet. Auf Whatmanpapier Nr. 1 und Nr. 4 ergab die Substanz einen lang gezogenen Fleck im  $R_f$ -Bereich von 0,3 bis 0,8 mit Stellen deutlich erhöhter Konzentration. Von der Fraktion B8 wurden grössere Substanzmengen auf dickes Chromatographiepapier (Whatman Nr.31) aufgetragen, in 60-proz. Propanol entwickelt, und die Zone stärkster Stoffkonzentration (um  $R_f$  0,7) wurde ausgeschnitten und eluiert. Diese chromatographierte Substanz wurde erneut in 60-proz. Propanol chromatographiert. Sie wanderte aber nicht einheitlich und ergab wie vorher einen langgezogenen Fleck.

Zugaben von Ameisensäure, Essigsäure oder von Ammoniak zum Lösungsmittel und Auftragen der Substanz als Natriumsalz ergaben keine besseren Resultate (30).

Die Fraktionen C (äthylacetatlöslich) und D (tetrahydrofuranlöslich) wanderten ebenfalls als langgezogener Fleck, am besten in Aethylacetat-Eisessig-Wasser (3 : 2 : 1) und die Fraktion E am besten in Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5) (organische Phase).

Säulenchromatographie : An Silikagel wurde die Verteilungschromatographie der Humusfraktionen B8 und C zwischen einer stationären, hydrophilen Phase (Wasser mit Schwefelsäure) und einer organophilen, mobilen Phase (Chloroform mit steigenden Mengen Butanol) versucht (Methode zur Trennung von Fettsäuren (43,46) ). Die Humusstoffe wurden aber, wegen der starken Hydrophilie und der starken Adsorptionsfähigkeit, zu stark im Silikagel zurückgehalten.

Die adsorptionschromatographische Auftrennung der Fraktion B8, C, D und E an Cellulosekolonnen und Kolonnen mit neutralisiertem Aluminiumoxyd (entaktiviert mit Methanol) versagten wegen zu starker Adsorption der Humusstoffe.

Zur chromatographischen Auftrennung müssten die Fraktionen eventuell organophiler gemacht werden. Da alle Fraktionen mit Dinitrophenylhydrazin reagieren, wurde versucht, Dinitrophenylhydrazin-Derivate der Humusfraktionen an Aluminiumoxyd und an Silikagel aufzutrennen, ähnlich wie Hydrazone von Ketosäuren (s. Lederer, 99).

Von den Fraktionen A7, B7 und E wurden durch 12-stündiges Schütteln in 0,2-proz. Lösung von Dinitrophenylhydrazin in 2-n. Salzsäure "Hydrazone" hergestellt. Diese waren in Säure und Wasser unlöslich und konnten abfiltriert werden. Sie lösten sich alle in Aethanol und Aethylacetat und zum grössten Teil in Chloroform. Das "Hydrazon" der Fraktion E war ätherlöslich. In Chloroform waren die "Hydrazone" gelb gefärbt und liessen sich mit 0,5-n. Natronlauge ausschütteln. Dabei wurde, ähnlich wie bei Hydrazonen von Ketosäuren, die Natronlauge dunkelrot verfärbt.

An Aluminiumoxyd liessen sich vom chloroformlöslichen Anteil der "Hydrazone" mit verschiedenen Lösungsmitteln Fraktionen abtrennen, die jedoch nicht als scharfe, schmale Zonen durch die Kolonnen liefen. Die vorliegenden Fraktionen bestanden offensichtlich aus vielen Verbindungen. Relativ scharf abgetrennte Fraktionen enthielten zu wenig Substanz für eine weitere Untersuchung. Zur Abtrennung genügend grosser Fraktionen müssten sehr grosse Kolonnen und grosse Mengen Ausgangssubstanzen verwendet werden. Wir konnten eine Kolonne von Silikagel (wo die Auftrennung besser war als an Aluminiumoxyd) von der Grösse 50 x 3 cm mit 60 g chloroformlöslichem "Hydrazon" beladen.

### 2333. Diskussion

Alle untersuchten Fraktionen (qualitative Tests mit den B-Fraktionen, mit der C-, D- und E-Fraktion) dekarboxylierten sowohl in 12-proz. Salzsäure als auch in Wasser. Der Chemismus der dekarboxylierbaren Fraktionen ist unbekannt. Die Fraktionen A1 bis A9 sind im chemischen Verhalten sehr ähnlich. Die Eigenschaften ändern sich kontinuierlich von A1 nach A8, so Farbe, Äquivalentgewicht, Löslichkeiten. Sie stellen wohl eine Reihe polymerhomologer Verbindungen dar. Deshalb und wegen der Empfindlichkeit (s. S. 16)

können kaum kristallisierbare Verbindungen isoliert werden.

Die Fraktionen sind sauerstoffreicher und reicher an Säuregruppen (Aequivalentgewicht um 170) als Huminsäuren. Der Stickstoffgehalt (ca. 1%) spielt eine untergeordnete Rolle (1 Atom N auf ein Aequivalentgewicht von 1400). Die Fraktionen wirken alle reduzierend, enthalten aber keine Zucker. Aus dem Kupferreduziervermögen darf deshalb nicht, wie dies schon oft gemacht wurde, auf reduzierende Zucker geschlossen werden.

Beim Dekarboxylieren entsteht ein huminsäureähnlicher Niederschlag. Vielleicht spielen sich dabei ähnliche Reaktionen ab wie bei der natürlichen Huminsäurebildung aus niedermolekularen Vorstufen (Fulvosäuren).

Die IR-Aufnahmen zeigen das gleiche Bild, wie diejenigen von Huminsäuren aus verrottetem Weizenstroh (135). Die Spektren haben keine scharfen Absorptionsbanden; dies deutet auf höhermolekularen Aufbau oder auf ein Stoffgemisch. Aus den IR-Spektren darf mit Sicherheit auf Karboxylgruppen und mit einiger Wahrscheinlichkeit auf (aliphatische) mit Diazomethan nicht-verätherbare Hydroxylgruppen und auf Aldehyde oder Ketone geschlossen werden. Auf Grund der IR-Spektren ist es fraglich, ob die so oft postulierten aromatischen oder chinoiden Strukturelemente in den untersuchten Fulvosäuren tatsächlich vorhanden sind.

Die UV-Spektren zeigen keine Maxima und sagen deshalb über den Chemosismus nichts aus.

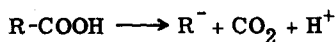
IR-Spektren sind nicht nur von der Fraktion C (äthylacetatlösliche Fraktion aus Humusortstein "Champex"), sondern auch von der Fraktion B ("Nante"), A7 (Humusortstein "Champex") und von der Fraktion E (ätherlösliche Fraktion aus Humusortstein "Champex") aufgenommen worden. Trotz der verschiedenen Herkunft und der verschiedenen Löslichkeiten zeigen alle Präparate die gleichen IR-Kurven. Deshalb darf für diese Stoffe, die sich auch chemisch und physikalisch ähnlich verhalten, ein gleicher, einheitlicher Aufbau angenommen werden. Dieser müsste durch genaue Strukturaufklärung einer möglichst niedermolekularen Fraktion (mit Huminsäureeigenschaften), z.B. der ätherlöslichen Fraktion E, studiert werden.

## 234. Dekarboxylierbare Gruppen von Humusstoffen

### 2341. Literatur über die Dekarboxylierung organischer Säuren

Die Bindung der Karboxylgruppen ist verschieden stark. Normale Fettsäuren und auch aromatische Karbonsäuren spalten erst unter extremen Bedingungen  $\text{CO}_2$  ab. Andere Karbonsäuren spalten schon bei Zimmertemperatur oder wenig erhöhter Temperatur  $\text{CO}_2$  ab. Die Reaktion verläuft manchmal spontan; oft wird sie durch Protonen, metallische Kationen oder organische Basen katalysiert.

Aus der Literatur (80, 85, 173) ist folgendes über die Struktur dekarboxylierbarer Säuren festzuhalten: Das Elektronenpaar, das den Karboxylkohlenstoff mit dem organischen Rest verbindet, bleibt bei der Abspaltung der Karboxylgruppe am organischen Rest.



Die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung wird deshalb begünstigt, wenn die Elektronendichte um das  $\alpha$ -C-Atom klein ist. Die ist der Fall bei:

- $\alpha$ -halogenierten Fettsäuren,
- N- und O-heterozyklischen  $\alpha$ -Karbonensäuren,
- $\alpha$ -Ketosäuren und
- $\alpha, \beta$ -ungesättigten Säuren (bewegliche  $\pi$ -Elektronen).

Die Dekarboxylierung dieser Säuren lässt sich durch Protonenakzeptoren katalysieren.

Gewisse Säuren dekarboxylieren auch bei hoher Elektronendichte des  $\alpha$ -C-Atoms. In  $\beta$ -Stellung muss dann ein kationoides Zentrum vorhanden sein, das die Aufnahme des die Karboxylgruppe bindenden Elektronenpaares in eine  $\alpha$ - $\beta$ -Doppelbindung ermöglicht. Durch Aktivierung des kationoiden Zentrums durch Säuren oder schwache Basen wird die Dekarboxylierung katalysiert.  $\beta$ -Ketosäuren und aromatische *o*-Hydroxykarbonsäuren dekarboxylieren nach diesem Mechanismus. 2,4- und 2,6-Dihydroxybenzoesäure, Pyrogallolkarbonsäure und Phlorogluzinkarbonsäure spalten bereits beim Erhitzen in Wasser  $\text{CO}_2$  ab. *m*-Hydroxybenzoesäuren sind stabiler.

$\text{CO}_2$  kann auch aus Verbindungen abgespalten werden, die keine Karboxylgruppen besitzen (z.B. Polykarbonylverbindungen (31) und Gerbstoffe (28)) oder aus Säuren, deren Karboxylgruppe als Laktone vorliegt (124).

## 2342. Versuche

Dekarboxylierung von Modellsubstanzen: Wir haben gefunden, dass sowohl künstliche als auch natürliche Huminsäuren dekarboxylieren. Aus p-Benzochinon nach Erdtman und Granath (45) in Natriumazetat-Lösung hergestellte künstliche Huminsäuren spalteten beim Erhitzen sowohl in 12-proz. Salzsäure (0,7 mÄq. CO<sub>2</sub> pro 1 g Huminsäure in 4 Stdn.) als auch in Wasser CO<sub>2</sub> ab. Gleich verhalten sich aus Hydrochinon hergestellte künstliche Huminsäuren\* (1,1 mÄq. CO<sub>2</sub> pro 1 g Huminsäure in 12-proz. HCl in 4 Stdn.). Hydrochinon und p-Benzochinon selbst spalten kein CO<sub>2</sub> ab.

Es liegt nahe, anzunehmen, dass die Phenylpropanstrukturelemente des Lignins auch in Fulvo- und Huminsäuren vorhanden sind. Beim Abbau des Lignins zu huminsäureähnlichen Verbindungen wird jeweils eine Zunahme von Karboxyl- und eine Abnahme von Methoxylgruppen beobachtet (74). Gorter (73) berichtet, dass Kaffeensäure, ein mögliches Abbauprodukt von Lignin bzw. Koniferylalkohol, beim Erhitzen in Mineralsäuren leicht dekarboxyliert. (Kaffeensäure wurde von Gorter (73) als Komponente der Chlorogensäure aus Kaffeebohnen und in neuerer Zeit von verschiedenen Autoren (158) aus Kernobst- und Traubensäften isoliert.) Kaffeensäure spaltete in unserem Versuch in 12-proz. Salzsäure bei 140°C Oelbadtemperatur in 4 Stunden quantitativ CO<sub>2</sub> ab. In Wasser dekarboxylierte Kaffeensäure in dieser Zeit nur zu 20 Prozent. Hydrokaffeensäure, durch Hydrierung der Doppelbindung der Seitenkette erhalten, dekarboxyliert nicht (73). Die der Kaffeensäure ähnliche Zimtsäure (keine OH-Gruppen am Benzolring) dekarboxyliert beim Erhitzen in 12-proz. Salzsäure nur wenig (10 Prozent in 4 Std.), und in Wasser ist sie stabil.

### Dekarboxylierung nach Hydrierung der Doppelbindungen:

Die Fraktion A5 (Humusortstein "Champex") wurde in absolutem Methanol mit Platinoxid bei Wasserstoff-Ueberdruck (20 cm Hg) hydriert, bis keine Wasserstoffaufnahme mehr beobachtet wurde (26 Stunden; s. S. 67). Die Dekarboxylierung in 12-proz. Salzsäure war vor und nach der Hydrierung gleich gross.

### Dekarboxylierung nach Reduktion mit Natriumborhydrid:

Die Fraktionen A1, A6 und A7 wurden mit Natriumborhydrid in 0,1-n. Natronlauge bei Zimmertemperatur (88) und in einer Lösung mit Anfangs-pH von 7,2 mit Natriumborhydrid während 3 Stunden reduziert. Nach der Reduktion wurde das überschüssige Natriumborhydrid mit Schwefelsäure zerstört, die Lösung

---

\*) Herrn Prof. Dr. E. Welte, Berlin-Dahlem, danke ich für die Ueberlassung der Hydrochinonhuminsäure.



neutralisiert und zur Dekarboxylierung am Vakuum konzentriert. Nach der Reduktion war die Dekarboxylierung (12-proz. HCl, 4 Stdn., 140°C) höchstens 10 Prozent geringer als vor der Reduktion (Fraktion A6, Tab. 6).

#### Azidität vor und nach der Dekarboxylierung in siedendem Wasser:

Vor und nach der Dekarboxylierung von Humusfraktionen in Wasser (7 Stdn., 140°C) wurde der Verbrauch an 0,1-n. Natronlauge bis pH 8,5 gemessen. Der grösste Unterschied ergab sich bei Fraktion A1. Der Verbrauch an 0,1-n. Natronlauge war nach Abspaltung von 0,5 mÄq. CO<sub>2</sub> aus 200 mg der Fraktion A1 um 0,5 cm<sup>3</sup> gesunken. Auf Grund der CO<sub>2</sub>-Abspaltung aus Karboxylgruppen hätte der Verbrauch an 0,1-n. Natronlauge um 2,5 cm<sup>3</sup> sinken müssen.

#### 2343. Diskussion

Falls die Dekarboxylierung der Humusstoffe auf ungesättigte Säuren oder auf Ketosäuren zurückzuführen ist, so sollte nach Hydrierung der Kohlenstoffdoppelbindungen oder nach Reduktion der Keto- und Aldehydgruppen mit Natriumborhydrid weniger CO<sub>2</sub> abgespalten werden; denn mit Natriumborhydrid werden Chinone, Aldehyde und Ketone im allgemeinen gut reduziert (88, 102). Dies ist nicht der Fall. Die Dekarboxylierung der Humusstoffe kann daher nicht solchen Strukturelementen zugeschrieben werden. Es ist jedoch nicht bewiesen, dass mit den angewandten Methoden sämtliche olefinischen Doppelbindungen hydriert und sämtliche Keto- und Aldehydgruppen reduziert worden sind.

Mit Platinoxid wurden bei Zimmertemperatur und Atmosphärendruck die Kohlenstoffdoppelbindung zwischen dem C-Atom 4 und dem C-Atom 5 der Uronsäurekomponente eines Disaccharides (101), die olefinischen Doppelbindungen in der Seitenkette (mit endständiger Karboxylgruppe) einer chinoiden Verbindung (124) und möglicherweise sogar Doppelbindungen in chinoiden Systemen (156) hydriert. In unserem mit Platinoxid hydrierten Humuspräparat war eine deutliche Zunahme des Wasserstoffgehaltes und eine Abnahme des Bromverbrauches festzustellen (s. S. 67).

Diese schonenden Reduktions- und Hydriermethoden könnten zur Strukturaufklärung der empfindlichen Humusstoffe dienen. Deshalb würde es sich lohnen, diese Methoden an Humusstoffen eingehend zu studieren.

Zur Dekarboxylierung sind auch N- und O-heterozyklische Säuren und aromatische o-Hydroxykarbonsäuren befähigt. Der N-Gehalt ist in den untersuchten Fraktionen jedoch unter 1 Prozent und variiert stark. Die Dekarboxylierung ist nicht damit verknüpft (Tab. 12 und 13).

In den Humusfraktionen konnten eindeutig aromatische Strukturen nicht erkannt werden (s. S. 64). Bei natürlichen und künstlichen Huminsäuren sollen O-heterozyklische Strukturen vorkommen (161).

Die Azidität nimmt beim Erhitzen in Wasser nicht der  $\text{CO}_2$ -Abspaltung entsprechend ab.  $\text{CO}_2$  wird auch von Verbindungen ohne Karboxylgruppen abgespalten. So spalten zum Beispiel verschiedene dehydrierte Reduktone als Polykarbonylverbindungen leicht  $\text{CO}_2$  ab (s. Dahn und Hauth, 31, und Tab. 1). Es ist daher nicht erstaunlich, dass aus p-Benzochinon und Hydrochinon hergestellte künstliche Huminsäuren  $\text{CO}_2$  abspalten. Bei der Herstellung der künstlichen Huminsäuren können Chinonringe aufgespalten werden und ungesättigte Karbonsäuren entstehen (53, 54, 138), welche  $\text{CO}_2$  abspalten können. Pilze bilden ebenfalls huminsäureähnliche Stoffwechselprodukte (52). Posternak et al. (124) haben einen gelben, chinoiden Pilzfarbstoff (Dihydroxy-2,2'-ditoluchinon-4,4') isoliert, der durch Erwärmen in verdünnten Säuren in ein rotbraunes, säureunlösliches, natronlaugelösliches (huminsäureähnliches) Produkt ohne Chinoneigenschaften übergeht. Dabei konnte durch schonende Chromoxydation eine chinoide, saure Verbindung isoliert werden, die beim Erhitzen  $\text{CO}_2$  aus der karboxylhaltigen, ungesättigten Seitenkette abspaltet.

Die dekarboxylierbaren Gruppen der Humusstoffe sind noch unbekannt. Die leichte  $\text{CO}_2$ -Abspaltung der Kaffeesäure lässt die Möglichkeit offen, dass beim biologischen Abbau des Lignins leicht dekarboxylierbare nichturonsäureartige Grundkörper entstehen. (Bei Uronsäurebestimmungen in Frucht- und Traubensäften nach Lefèvre und Tollens ist die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung der Kaffeesäure zu berücksichtigen).

### 3. SCHLUSSBETRACHTUNG

Die Untersuchung hat ergeben, dass der grösste Teil der beim Erhitzen in 12-proz. Salzsäure dekarboxylierenden Verbindungen der organischen Bodensubstanz nicht Uronsäuren sind. Die Dekarboxylierung ist als eine Eigenschaft der gefärbten Verbindungen der organischen Bodensubstanz zu betrachten.

Dies zeigt einmal mehr (s. S. 62) die Fragwürdigkeit indirekter Methoden zur chemischen Untersuchung der organischen Bodensubstanz.

Es ist notwendig, möglichst reine, vielfach fraktionierte Humuspräparate herzustellen, auf die analytische Methoden mit besserem Erfolg angewendet werden können. Dabei ist zu beachten, dass die organische Bodensubstanz sehr empfindlich ist und für alle zu untersuchenden Böden vorerst schonende Extraktionsmethoden gefunden werden müssen. Für Podsol-B<sub>h</sub>-Horizonte eignet sich Komplexon III.

Aus solchen Extrakten müssen mitextrahierte anorganische Verbindungen und das Extraktionsmittel quantitativ und ohne Verlust organischer Verbindungen entfernt werden können. Bei der Verwendung von Ionenaustauschern ist abzuklären, welche Verbindungen sorbiert werden. Dann wird es vorteilhaft sein, möglichst grosse Substanzmengen vorerst mit Lösungen mehrwertiger Kationen oder mit organischen Lösungsmitteln fraktioniert zu fällen. Anschliessend ist mit feineren elektrophoretischen und chromatographischen Methoden (ev. an organophileren Präparaten (s.S. 69)) die weitere Fraktionierung zu versuchen.

Wenn auf diese Weise möglicherweise auch keine kristallisierbaren Verbindungen isoliert werden können, so wird sich die Anwendung moderner Analysemethoden auf solche Präparate dennoch lohnen.

## 4. MATERIAL

### 41. Böden

#### Podsolböden :

1. Humusortstein "Champex": Proben aus dem verfestigten  $B_h$ -Horizont eines subalpinen Podsolbodens unter Rhododendro-Abietetum (7) (Champex; Kt. Wallis).

pH 4,4 ; C 1,2 % ; N 0,01 %

2. Humusorte "Champex": Proben aus dem nicht verfestigten (dem Ortstein aufliegenden)  $B_h$ -Horizont des oben erwähnten Podsols.

pH 4,8 ; C 1,8 % ; N 0,01 %

3. Humusorte "Nante": Proben aus dem dunkelbraunen  $B_h$ -Horizont eines subalpinen Podsolbodens unter Rhodoreto-Vaccinietum extrasilvaticum (in der Nähe des von Frei (61) beschriebenen Podsols) (Nante; Kt. Tessin).

pH 4,4 ; C 6,0 % ; N 0,01 %

#### Braunerde :

Proben aus der intensiv durchwurzelten Schicht (3-10 cm Tiefe) des Humushorizontes einer Braunerde unter Dauerweide (Koppigen; Kt. Bern).

pH 6,7 ; C 2,8 % ; N 0,27 %

### 42. Modellsubstanzen

Die Galakturonsäure wurde durch enzymatischen Abbau von Pektinsäure gewonnen\*. Die Kaffeesäure und die Zimtsäure wurden von der Firma Fluka A.G., Buchs (St. Gallen), bezogen. Die Benzochinonhuminsäure wurde in Natriumazetatlösung nach Erdtman und Granath 45) hergestellt. Die Hydrochinonhuminsäure wurde von Prof. Dr. E. Welte, Göttingen, zur Verfügung gestellt\*\*. Die Strohproben wurden durch Abbau in alkalischem Milieu erhalten (135)\*\*\*.

---

\*) Herrn dipl.ing.chem. R. Derungs, \*\*) Herrn Prof. Dr. E. Welte, Berlin-Dahlem und \*\*\*) Herrn dipl. ing. agr. U. Schobinger danke ich für die Ueberlassung der Substanzen.

## 5. METHODEN

### Dekarboxylierung (Abschnitte 2121 - 2126, 2222, 2332, 2342)

Wir haben für die Dekarboxylierung eine eigene Apparatur konstruiert (Fig. 12)\*. Dabei kann das  $\text{CO}_2$  zu verschiedenen Zeiten nach folgendem Prinzip bestimmt werden. Das im Reaktionsgefäß A entwickelte  $\text{CO}_2$  strömt im  $\text{N}_2$ -Strom z.B. durch den rechten Ast der Apparatur in das Absorptionsgefäß G. Zur Zeit t werden die beiden Dreiweghahnen B und B' in Stellung 1 bzw. 2 gebracht. Das Gasgemisch wird nun durch den linken Ast getrieben, gleichzeitig aber wird das restliche  $\text{CO}_2$  im Kühler und in den Waschflaschen E und F des rechten Astes durch den im H eintretenden Stickstoff in das Absorptionsgefäß ausgetrieben.

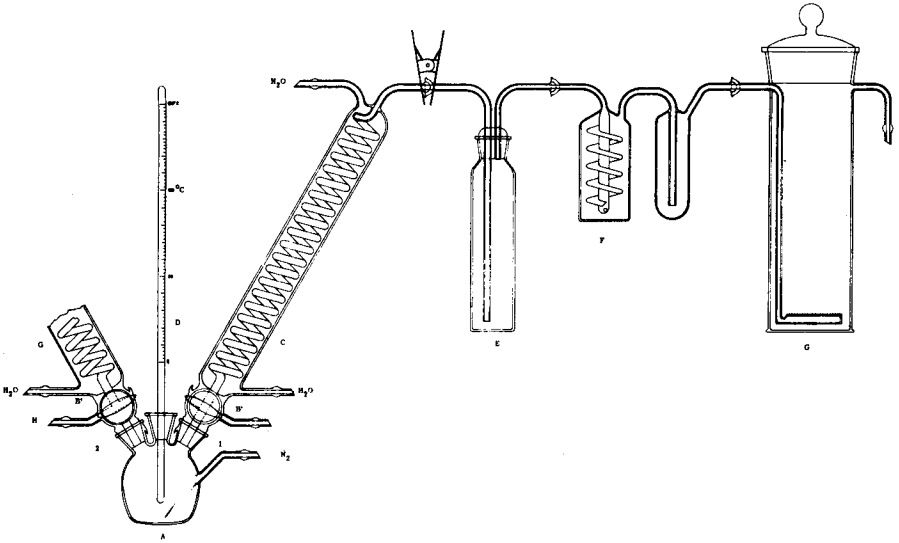
Von der zu dekarboxylierenden Substanz wird eine Menge, die nicht über 3 mäß.  $\text{CO}_2$  entwickelt, in das mit 2 Schlangenkühlern C und einem Thermometer D versehene Reaktionsgefäß A gebracht und  $50 \text{ cm}^3$  des entsprechenden Dekarboxylierungsmediums zugegeben. Zur Befreiung von Luft- $\text{CO}_2$  und eventuellem Karbonat- $\text{CO}_2$  wird aus einer  $\text{N}_2$ -Bombe  $\text{N}_2$  durch die Apparatur gepresst und zwar für unlösliche Materialien

- in 12-proz. Salzsäure während 1 Stunde,
- in verdünnten Säuren während 3 Stunden,
- in Wasser und Pyridin während 18 Stunden,

und für lösliche Materialien in Säuren während 1 Stunde und in Wasser und Pyridin während 4 Stunden. Da Pyridin geringe Mengen  $\text{CO}_2$  absorbiert, wird dieses Dekarboxylierungsmedium bei der entsprechenden Reaktionstemperatur mit  $\text{CO}_2$  vor dem "Entlüften" mit  $\text{CO}_2$  gesättigt. Bei der metallkatalytischen Dekarboxylierung (s.S. 25) wird das Nickelazetat (800 mg Nickelazetat auf  $40 \text{ cm}^3$  Pyridin) nach dem Sättigen mit  $\text{CO}_2$  und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur zugesetzt. Nach dem "Entlüften" wird mit dem bereits auf die entsprechende Temperatur eingestellten Oelbad erhitzt.

Der durch die Apparatur während der gesamten Messung strömende  $\text{N}_2$  vertreibt das im Reaktionsgefäß entstehende  $\text{CO}_2$ . Der Gasstrom wird in salzsaurer Phlorogluzinlösung E von Fufurol und in 10-proz. Silbernitratlösung F von Salzsäure befreit. Das  $\text{CO}_2$  wird im Absorptionsgefäß G, das unter Stickstoff mit  $100 \text{ cm}^3$  ca. 0,1-n.  $\text{BaCl}_2$  und  $50 \text{ cm}^3$  0,1-n. NaOH (bekannter Faktor) beschickt wurde, aufgefangen. Nach der gewünschten Zeit wird das Absorptionsgefäß entfernt und unter Stickstoff mit 0,1-n. HCl und Phenolphthalein titriert.

\*) Herr Dr. G. Zweifel danke ich für die Mitarbeit.



**Figur 12: Dekarboxylierungs-Apparatur**

**Herstellung der Extrakte zur chromatographischen Prüfung auf Uronsäuren  
und neutrale Zucker (Abschnitte 222 (S. 25); 2223 (S. 29) )**

**Aetherextrakt:** 10 g lufttrockener Boden wurden während 24 Stunden mit Aether nach Schwartz et al. (139) im Soxhlet extrahiert. Im Extraktionskolben wurde keine Lauge vorgelegt. Die Extrakte konnten deshalb nach dem Konzentrieren direkt chromatographisch untersucht werden (s.S. 27).

**Wasser- und Säureextrakte:** 10 g lufttrockener Boden wurden in Polyäthylenflaschen von 200 cm<sup>3</sup> Inhalt während 24 Stunden auf der Schüttelmaschine mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser bzw. 0,1-n. Schwefelsäure geschüttelt. Dann wurde abzentrifugiert und das Zentrifugat, wie auf Seite 27 beschrieben, chromatographisch untersucht.

**Hydrolyseextrakte:** 10 g lufttrockener Boden wurden nach den Angaben der Tab. 7 im Hydrolysierrohr bzw. im Autoklaven hydrolysiert und gemäss den Angaben auf Seite 37 chromatographisch untersucht.

## Reduktion von Humusextrakten mit Natriumborhydrid

(Abschnitte 2222 (S.25) und 2342 (S. 72) )

In einem 250-cm<sup>3</sup>-Dreihalskolben wurden 150 mg Natriumborhydrid in 50 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, und unter Rühren (Vibromischer) wurde aus dem seitlich angebrachten Tropftrichter die in 0,1-n. Natronlauge (50 cm<sup>3</sup>) gelöste Humusfraktion (200 mg) langsam zutropfen und 3 Stunden reagieren gelassen. In einem anderen Versuch wurde die in Wasser gelöste Humusfraktion mit Natronlauge auf pH 7,6 eingestellt, auf ein Volumen von 50 cm<sup>3</sup> gebracht und zur vorgelegten wässrigen Natriumborhydridlösung zutropfen gelassen. Die Lösung wurde auf eine Temperatur von 40°C erwärmt und unter Rühren 2 Stunden reagieren gelassen. Dann wurde, für die anschließende Dekarboxylierung, in beiden Fällen mit 2-n. Schwefelsäure vorsichtig angesäuert und nach dem Zerstören des überschüssigen Natriumborhydrids mit Natronlauge neutralisiert und auf 30 cm<sup>3</sup> konzentriert. Dann wurde abgekühlt und mit 15 cm<sup>3</sup> konzentrierter Salzsäure in das Dekarboxylierungs-Reaktionsgefäß übergespült und dekarboxyliert.

## Extraktion dekarboxylierbarer Humusstoffe (Abschnitt 2312 (S. 39))

Für die orientierenden Vorversuche (Tab. 10 und 11 und Fig. 4) wurden je 10 g lufttrockener Boden mit 100 cm<sup>3</sup> Extraktionsmittel-Lösung in 200-cm<sup>3</sup>-Polyäthylenflaschen geschüttelt, bei Zimmertemperatur auf der Schüttelmaschine und bei erhöhten Temperaturen ab und zu von Hand. Extraktionen bei Temperaturen über 60°C wurden am Rückflusskühler durchgeführt.

Nach der Einwirkungsdauer wurde auf einer G3-Nutsche abgenutscht und mit 100 cm<sup>3</sup> Wasser gewaschen. Oefters musste zentrifugiert werden. Das Filtrat oder Zentrifugat wurde neutralisiert, am Vakuum auf 30 cm<sup>3</sup> konzentriert und mit 15 cm<sup>3</sup> konz. Salzsäure zum Dekarboxylieren in das Reaktionsgefäß überspült.

## Gewinnung der Humusfraktionen (Abschnitt 2322 (S. 49) )

2 kg lufttrockener Boden wurden in einer 5-Liter-Polyäthylenflasche mit 50 g Komplexon III und 2 Liter Wasser während 15 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Dann wurde sedimentieren gelassen und dekantiert. Das Dekantat wurde zentrifugiert und das Sediment zum Bodenrückstand in

die Flasche zurückgebracht und nochmals in gleicher Weise mit 2 Liter Wasser und 50 g Komplexon III extrahiert. Die Extraktionsflüssigkeit wurde mit der Ultrazentrifuge bei 25000 Touren/Min. klar zentrifugiert. Dann wurde nacheinander durch eine Kolonne von 2 Liter Kationenaustauscher "Dowex 50" (in der H-Form) und durch eine Kolonne von 4 Liter Anionenaustauscher "Dowex 2" (in der OH-Form) perkolieren gelassen und mit Wasser gewaschen, bis das Perkolat nur noch schwach gelblich gefärbt austrat. Nun wurde am Vakuum konzentriert, bis sich braune Substanzen an der Glaswand des Destillierkolbens abzulagern begannen, und anschliessend stufenweise mit konzentrierter Bariumhydroxyd-Lösung neutralisiert. Die Fraktionen A 1 bis A 8 bzw. B 1 bis B 8 fielen der Reihe nach bei folgenden pH-Werten aus: 1,8; 2,0; 2,5; 3,1; 3,7; 4,7; 6,4 und 7. Durch Konzentrieren der verbleibenden hellgelben Lösung am Vakuum bis zur leichten Trübung und Fällern im 5-fachen Volumen 95-proz. Aethanol wurden die Fraktionen A 9 bzw. B 9 erhalten. Die Fraktionen wurden jeweils durch Zentrifugieren gewonnen und zweimal mit Wasser ausgewaschen. Das Waschwasser wurde zur abzentrifugierten Lösung gegeben. Dann wurden die Fraktionen mit "Dowex 50" und einer entsprechenden Menge Wasser versetzt, die Zentrifugengläser mit einem Gummistopfen verschlossen und geschüttelt, bis wieder eine klargefärbte Lösung entstand. Der Austauscher wurde mit der Lösung in ein Perkolationsrohr, das mit 20 cm<sup>3</sup> frischem Kationenaustauscher beschickt war, gespült, die Lösung perkolieren gelassen und mit Wasser gewaschen. Nun wurde mit Bariumhydroxyd umgefällt, mit Wasser, wenn nötig mit Spuren von Bariumchlorid-Zugaben, zweimal gewaschen und das Barium mit "Dowex 50" wieder entfernt. Die Lösung wurde am Vakuum konzentriert und anschliessend gefriergetrocknet.

Die Gewinnung der Fraktionen C, D und E ist auf Seite 51 beschrieben.

#### Herstellung der Präparate für die IR-Aufnahmen (S. 63)

Behandlung der Humusfraktionen mit Diazomethan: Zur Lösung der Substanz in absolutem Methanol wurde ein Ueberschuss an Diazomethan (in Aether) gegeben und im Destillierkolben, verschlossen mit einem Kork mit Chlorkalziumrohr, über Nacht bei 0° C im Kühlschrank stehen gelassen. Dann wurde am Vakuum Lösungsmittel und Diazomethan abdestilliert. Der Rückstand wurde in möglichst wenig Chloroform gelöst, filtriert und im ca. 200-fachen Volumen Aether gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, mit Aether gewaschen und am Hochvakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.



Reduktion der Humusfraktionen mit Natriumborhydrid: Die Fraktion C wurde, wie oben beschrieben (s.S. 79), bei pH 7,2 und unter Einleiten von Stickstoff und leichtem Erwärmen mit Natriumborhydrid reduziert und mit der entsprechenden Menge "Dowex 50" entkationisiert. Die entstandene Borsäure liess sich nicht entfernen. Deshalb musste dieses Präparat zur IR-Untersuchung mit Diazomethan nach Angaben der Seite 80 behandelt werden. Beim Abdestillieren am Vakuum liess sich die Borsäure auf einfache Weise quantitativ entfernen. Durch Fällen der Chloroformlösung im Aether wurde das reduzierte und veresterte Präparat erhalten.

#### Bestimmung der Doppelbindungen mit methanolischer Bromlösung

Herstellung der Bromlösung: Man gibt zu 1'000 Teilen Methanol (über gebranntem Kalk abdestilliert) 120 bis 150 Teile Natriumbromid (bei 130°C getrocknet), dekantiert die Lösung und lässt aus einer Bürette 5,2 cm<sup>3</sup> Brom zufließen (84).

Ausführung der Bestimmung: In einem Erlenmeyerkolben von 250 cm<sup>3</sup> Inhalt mit Glasstopfen werden 50 mg der zu untersuchenden Humusfraktion eingewogen und in 15 cm<sup>3</sup> absolutem Methanol gelöst und 5 cm<sup>3</sup> Bromlösung zugegeben, der Glasstopfen aufgesetzt und 30 Minuten bzw. 24 Stunden bei Zimmertemperatur in der Dunkelheit reagieren gelassen. Dann wird mit 15 cm<sup>3</sup> 10-proz. Kaliumjodid-Lösung und 50 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt und mit 0,1-n. Natriumthiosulfatlösung titriert. Unter gleichen Bedingungen wird ein Blindversuch durchgeführt. Aus der Differenz des Verbrauches an Thiosulfatlösung kann die Anzahl der Doppelbindungen berechnet werden.

#### Hydrierung von Humusfraktionen mit Platinoxid (s.S. 67 und 72)

Im Kolben einer gewöhnlichen Hydrierapparatur wurden 100 mg Platinoxid (nach Adams und Shriner, (3)) in 50 cm<sup>3</sup> absolutem Methanol in Wasserstoff-Atmosphäre unter Schütteln reduziert, bis keine H<sub>2</sub>-Aufnahme mehr festzustellen war. Dann wurde die Humusfraktion (200 mg), die sich in einem seitlich angebrachten Reservoir befand, zugegeben und unter Schütteln reagieren gelassen, bis keine Wasserstoffaufnahme mehr festzustellen war (ca. 26 Stdn.). Die Reaktion wurde abgebrochen und die Lösung filtriert. Das Filterpapier mit dem Platinoxid verbrannte beim Trocknen an der Luft, was beweist, dass der Katalysator noch aktiv war. Die Lösung wurde am Vakuum konzentriert und dekarboxyliert.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung aus karbonatfreien Bodenproben (aus Braunerde und aus Podsol- $\text{B}_h$ -Horizonten) und aus Galakturonsäure wird bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Medien untersucht. Die organische Substanz des Bodens spaltet, im Unterschied zur Galakturonsäure, in neutralen Medien und bei Temperaturen unter  $100^\circ\text{C}$  bedeutende Mengen  $\text{CO}_2$  ab. In sich zersetzendem Weizenstroh nimmt die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung beim Erhitzen in 1-proz. Schwefelsäure mit zunehmender Zersetzung relativ und absolut zu, während die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung durch Erhitzen in 12-proz. Salzsäure (absolut) stark abnimmt.
2. Mit verschiedenen Methoden (metallkatalytischer Dekarboxylierung, Papierchromatographie von Extrakten und Hydrolysaten, Furfurol- und Reduktinsäurebestimmung) gelingt es nicht, im Boden oder in Humusfraktionen Uronsäuren in Mengen, die der Dekarboxylierung entsprechen, nachzuweisen.
3. Die Dekarboxylierungsmethode von Lefèvre und Tollens kann daher nicht zur Bestimmung der Uronsäuren in der organischen Bodensubstanz oder in sich zersetzendem Pflanzenmaterial verwendet werden.
4. Es werden verschiedene Verbindungen auf die Fähigkeit zur Extraktion dekarboxylierbarer Stoffe aus dem Boden geprüft. Zur Extraktion von Podsol- $\text{B}_h$ -Horizonten eignen sich am besten Komplexbildner, vor allem Komplexon III (schonende Extraktion bei pH 4 bis 5).
5. Komplexon-III-Extrakte aus Podsol- $\text{B}_h$ -Horizonten werden mit Ionenaustauschern vom Extraktionsmittel und von mitextrahierten anorganischen Verbindungen befreit und durch Fällung mit  $\text{Ba}^{++}$  und durch Lösen in organischen Lösungsmitteln fraktioniert.
6. Die Säureäquivalentgewichte dieser Humusfraktionen liegen zwischen 130 und 200.
7. Die IR-Spektren der Humusfraktionen lassen auf Karboxyl- und assoziierte OH-Gruppen schließen. Chinoide und aromatische Strukturen aber sind auf diesem Wege nicht nachweisbar.
8. Kohlenstoffdoppelbindungen und Carbonylgruppen scheinen in den Humusfraktionen vorhanden zu sein, können aber noch nicht quantitativ bestimmt werden.

9. Die IR-Spektren und das Misslingen der Isolierung reiner Verbindungen aus den Humusfraktionen lassen auf ein Stoffgemisch und ( oder ) auf höhermolekulare Verbindungen schliessen.
10. Die meisten Humusfraktionen enthalten keine Zucker und keine Uronsäuren (papierchromatographisch nach der Hydrolyse geprüft), dekarboxylieren aber beim Erhitzen in Säuren oder in Wasser trotzdem. Die  $\text{CO}_2$ -Abspaltung der Humusfraktionen ist stark mit dem Kohlenstoffgehalt korreliert. Die leichte  $\text{CO}_2$ -Abspaltung scheint eine besondere Eigenschaft der Humusstoffe zu sein.
11. Die Dekarboxylierung wird durch Hydrierung mit Platinoxid und durch Reduktion mit Natriumborhydrid nicht wesentlich vermindert. Bei der Dekarboxylierung in Wasser nimmt die Azidität nicht der Dekarboxylierung entsprechend ab.

## 7. LITERATUR

1. F.K. Achard, *Crell's Chem. Ann.* 2, 391 (1786)
2. C.N. Acharya, *Biochem. J.* 31, 1800 (1937)
3. R. Adams und R.L. Shriner, *J. Am. Chem. Soc.* 45, 1071 (1923);  
*J. Am. Chem. Soc.* 46, 1683 (1924)
4. L.T. Alexander und H.C. Horace, *U.S. Dept. Agric., Techn. Bull.* 317, (1932)
5. E. Alvsaker, *Diss.*, Bergen, 1948
6. R. Bach und H. Deuel, *Schweiz. Z. Forstwesen* 104, 195 (1953)
7. R. Bach, R. Kuoeh und R. Iberg, *Mitt. Schweiz. Anstalt forstl. Versuchswesen* 30, 299 (1954)
8. W.V. Bartholomew und A.G. Norman, *Iowa State Coll. J. Sci.* 15, 253 (1941)
9. V.A. Beckeley, *J. Agric. Sci.* 11, 66 (1921)
10. R.S. Beckwith, *Austral. J. Agric. Res.* 6, 685 (1955)
11. D.J. Bell, in K. Paech und M.V. Tracey, "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse". Berlin, 1955, Bd. II, S. 47
12. L.J. Bellamy, "Ultraspektrum und chemische Konstitution". Darmstadt, 1955, S. 132
13. E. Biesalzki und W. Berger, *Braunkohle* 23, 197 (1924)
14. J.R. Bowman und R.B. McKinnis, *J. Am. Chem. Soc.* 52, 1209 (1930)
15. J.M. Bremner, S.G. Heintze und P.J.G. Mann, *Nature* 158, 790 (1946)
16. J.M. Bremner und H. Lees, *J. Agric. Sci.* 39, 274 (1949)
17. J.M. Bremner, *Analyst* 74, 492 (1949)
18. J.M. Bremner, *Biochem. J.* 47, 538 (1950)
19. J.M. Bremner, *J. Soil Sci.* 1, 198 (1950)
20. J.M. Bremner, *J. Soil Sci.* 2, 67 (1951)
21. J.M. Bremner, *J. Sci. Food Agr.* 3, 497 (1952)
22. J.M. Bremner, *J. Soil Sci.* 5, 214 (1954)
23. W.G. Campbell, E.L. Hirst und G.T. Young, *Nature* 142, 912 (1938)
24. G. de Chalmot, *J. Am. Chem. Soc.* 16, 229 (1894)
25. R. Chaminade, *C.R. Acad. Agric.* 32, 131 (1946)
26. R. Chaminade, *Ann. Agron.* 16, 119 (1946)
27. A.J. Charlson, J.R. Nunn und A.M. Stephen, *J. Chem. Soc.* 1955, 269 (1955)
28. A. Cheshire, *J. Intern. Soc. Leather Trades Chem.* 22, 452 (1938)
29. H. Colin und S. Lemoine, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 20, 343 (1938)
30. F. Cramer, "Papierchromatographie". Weinheim, 1954
31. H. Dahn und H. Hauth, *Helv. Chim. Acta* 39, 1366 (1956)
32. H. Deuel, *Schweiz. Landw. Monatsh.* 30, 1 (1952)
33. A.D. Dickson, H. Otterson und K.P. Link, *J. Am. Chem. Soc.* 52, 775 (1930)
34. Z. Dische, *J. Biol. Chem.* 167, 189 (1947)

35. W.H. Dore, J.Am.Chem.Soc. 48, 232 (1926)
36. P. Dubach, G. Zweifel, R. Bach und H. Deuel, Z.Pflanzenernähr.,  
Düng. Bodenk. 69, 97 (1955)
37. R.B. Duff, J.Sci. Food Agr. 3, 140 (1952)
38. R.B. Duff, Chemistry & Industry 1952, 1104 (1952)
39. R.B. Duff, Chemistry & Industry 1952, 1513 (1954)
40. A.P. Dunlop und F.N. Peters, "The Furans". New York, 1953, S. 278
41. A. Eberle, Diss., E.T.H., Zürich, 1950, S.29
42. W. Eller, Ann. 431, 133 (1923)
43. S.R. Elsdon, Biochem. J. 40, 252 (1946)
44. L.E. Ensminger und J.E. Giesecking, Soil Sci. 53, 205 (1942)
45. H. Erdtman und M. Granath, Acta Chem. Scand. 8, 811 (1954)
46. D. Fairbain und R.P. Harpur, Canad. J.Chem. 29, 633 (1951)
47. F. Feigl, "Spot Tests". Amsterdam, 1954, S.132
48. H. Feilitzen, von, und B. Tollens, J.Landwirtsch. 46, 17 (1898)
49. F. Fischer und K. Schrader, Abh. Kohle 6, 1 (1923)
50. F.G. Fischer und H. Dörfel, Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem. 301, 224 (1955)
51. F.G. Fischer und H. Dörfel, Hoppe Seyler's Z.physiol. Chem. 302, 186 (1955)
52. W. Flaig, E. Küster, G. Segler-Holzweissig und H. Beutelspacher,  
Z.Pflanzenernähr., Düng. Bodenk. 57, 42 (1952)
53. W. Flaig, H. Schulze, E. Küster und H. Biergans, Landbouwkundig Tijdschrift  
66, 392 (1954)
54. W. Flaig, H. Beutelspacher und H. Söchting, Kalium-Symposium 1954,  
Bern, 1955, S. 81
55. W. Flaig, F. Scheffer und B. Klamroth, Z.Pflanzenernähr., Düng.Bodenk.  
71, 33 (1955)
56. W. Flaig, "Landw. Forschung". Sonderheft 6, 94 (1954)
57. W.G.C. Forsyth, Nature 160, 607 (1947)
58. W.G.C. Forsyth, Biochem.J. 41, 176 (1947)
59. W.G.C. Forsyth, J.Agr.Sci. 37, 132 (1947)
60. W.G.C. Forsyth, Biochem. J. 46, 141 (1950)
61. E. Frei, Diss., E.T.H., Zürich, 1944, S. 321
62. E. Frei und E. Schütz, Landw. Jahrbuch Schweiz 67, 563 (1953)
63. K. Freudenberg und M. Harder, Ber. 60, 581 (1927)
64. K. Freudenberg, H. Dietrich und W. Siebert, Ber. 84, 961 (1951)
65. W.H. Fuller, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 11, 280 (1946)
66. W.H. Fuller und A.G. Norman, J. Bact. 50, 667 (1946)
67. W.H. Fuller, W.V. Bartholomew und A.G. Norman, Soil Sci. 64, 143 (1947)
68. W.H. Fuller, Soil Sci. 64, 183 (1947)

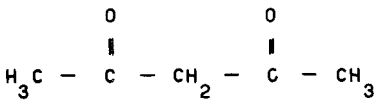
69. W.H. Fuller, Soil Sci. 64, 403 (1947)
70. W.H. Fuller, Soil Sci. 64, 453 (1947)
71. L. Gattermann und H. Wieland, "Die Praxis des organischen Chemikers". Berlin, 1939, S. 373
72. M.J. Geoghegan und R.C. Brian, Nature 158, 837 (1946)
73. K. Gorter, Ann. 379, 110 (1911)
74. S. Gottlieb und S.B. Hendricks, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 10, 117 (1946)
75. F. Gstirner, "Chemische Vitaminbestimmungs- Methoden". Stuttgart, 1939
76. C.D. Gutsche, in "Organic Reactions". New York, 1954, Vol. VIII, S. 385
77. A. Hamy und G. Leroy, Ann.Agron. 3, 939 (1952)
78. W.N. Haworth, Nature 158, 836 (1946)
79. O.L. Heinen, Diss., München, 1937
80. H. Henecka, in J. Houben und Th. Weyl, "Methoden der organischen Chemie", Stuttgart, 1953, Bd. VIII, S. 484
81. A. Hock, Z.Pflanzenernähr., Düng.Bodenk. 5, 1 (1937)
82. P. Hoffmann, A. Linker und K. Meyer, Science 124, 1252 (1956)
83. F. Hoppe-Seyler, Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 13, 66 (1889)
84. J. Houben und Th. Weyl, "Methoden der organischen Chemie". Stuttgart, 1953, Bd. II, S. 305
85. G.L. Huber, Diss., E.T.H., Zürich, 1951
86. H. Hudig und L. van Reesema, Landbouwkundig Tijdschrift 52, 529 (1940)
87. G. Jayme und P. Sarten, Biochem. Z. 310, 1 (1941)
88. E.H. Jensen, "A Study of Sodiumborohydride". Copenhagen, 1954, S. 83
89. J.S. Joffe, "Pedology". New Brunswick, 1949, S. 191
90. A. Johansson, Svensk Papperstidn. 55, 820 (1952)
91. A. Johansson, B. Lindberg und O. Theander, Svensk Papperstidn. 57, 41 (1954)
92. P. Karrer und B. Boding-Wiegner, Helv.Chim.Acta 6, 817 (1923)
93. D.J.W. Kreulen und F.G. Kreulen von Selms, Brennstoff-Chem. 38, 49 (1957)
94. S.F. Kudizin, R.M. De Baum und F.F. Nord, J.Am.Chem.Soc. 73, 4615 (1951)
95. W. Laatsch, Z. Acker- und Pflanzenbau 91, 491 (1950)
96. W. Laatsch, "Dynamik der mitteleuropäischen Mineralböden". Leipzig, 1954, S. 123, 134
97. R.A. Laidlaw und E.G.C. Percival, J.Chem.Soc. 1949, 1600 (1949)
98. K.U. Lefèvre und B. Tollens, Ber. 40, 4153 (1907)
99. E. Lederer und M. Lederer, "Chromatography". Amsterdam, 1954, S. 77 ff
100. K.P. Link und C. Niemann, J.Am.Chem.Soc. 52, 2474 (1930)
101. A. Linker, K. Meyer und Ph. Hoffmann, J. Biol.Chem. 219, 13 (1956)
102. B. Lindberg und J. Paju, Ind. Eng.Chem. 48, 162 (1956)
103. D.L. Lynch und L.J. Cotnoir, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 20, 367 (1956)

104. D.L. Lynch, E.E. Hearns und L.J. Cotnoir, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 21, 160 (1957)
105. A.E. Martell und E. Calvin, "Chemistry of the Metal Chelate Compounds:" New York, 1952, S. 514 ff
106. P. Martin, Soil Sci. 61, 157 (1946)
107. A.E. Martin und R. Reeve, Chemistry & Industry 13, 356 (1955)
108. S. Mattson und E. Koutler-Andersson, Ann.Agric.Coll.Swed. 12, 70 (1944)
109. A.D. McLaren, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 18, 170 (1954)
110. R.B. McKinnis, J.Am.Chem.Soc. 50, 1911 (1928)
111. M.M. Mortland und J.E. Gieseeking, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 16, 10 (1952)
112. R.F. Nickerson, Ind.Eng.Chem. 33, 83 (1941)
113. R.F. Nickerson, Ind.Eng.Chem.,Anal.Ed. 13, 423 (1941)
114. A.G. Norman, Biochem. J. 23, 1367 (1929)
115. A.G. Norman und T.J. Martin, Biochem. J. 24, 649 (1930)
116. A.G. Norman, Nature 143, 284 (1939)
117. A.G. Norman und W.V. Bartholomew, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 5, 242 (1940)
118. A.G. Norman und W.V. Bartholomew, Soil Sci. 56, 143 (1943)
119. L.W. Norris und C.E. Resch, Biochem.J. 29, 1590 (1935)
120. H.F. Perkins und E.R. Purvis, Soil Sci. 78, 325 (1954)
121. M. Pieltre, C.R. Acad.Sci. 177, 486 (1923)
122. W.P. Pigman und R.M. Goepf, "Chemistry of the Carbohydrates". New York, 1948, S. 134
123. V.V. Ponomareva, Pochvovedenie 714 (1947); ref. Soils & Fertilizers 11, 300 (1948)
124. Th. Posternak, R. Huguenin und W. Alcalay, Helv.Chim.Acta 39, 1564 (1956)
125. J.H. Quastel, Soil Sci. 73, 419 (1952)
126. T. Reichstein und R. Oppenauer, Helv. Chim. Acta 16, 988 (1933)
127. D.A. Rennie, E. Truog und O.N. Allen, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 18, 399 (1954)
128. W.O. Robinson, U.S.Dept. Agric.Circ. 139 (1930)
129. M.D. Rydalevskaja und R. Tishenko, Pedology(USSR) 10, 491 (1944) ref. (89)
130. W. Scheele, Kolloid-Z. 77, 312 (1936)
131. F. Scheffer und E. Welte, Naturwiss. 37, 321 (1950)
132. F. Scheffer, B. Ulrich und P. Hiestermann, Z. Pflanzenernähr., Düng.Bodenk. 76, 146 (1957)
133. E. Schlichting, Z. Pflanzenernähr., Düng. Bodenk. 61, 97 (1953)
134. M. Schnitzer und J.R. Wright, Canad. J.Agric.Sci. 36, 511 (1956)
135. U. Schobinger, Diss. E.T.H., Zürich, 1957 (im Druck)
136. A.W. Schorger, Ind.Eng.Chem. 15, 748 (1923)
137. O. Schreiner und E.C. Shorey, U.S.Dept.Agric.Bur.Soils, Bull. 74, (1910)

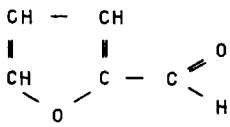
138. H. Schulze und W. Flaig, Ann. 575, 231 (1952)
139. S.M. Schwartz, J.E. Varner und W.P. Martin, Soil Sci.Soc.Amer., Proc. 18,  
174 (1954)
140. G. Schwarzenbach, "Die komplexometrische Titration". Stuttgart, 1955, S. 64
141. F. Sestini, Landwirtsch. Vers. Sta. 27, 163 (1882); ref. Chem. Centralblatt 1,  
182 (1902)
142. E.C. Shorey und E.C. Lathrop, J. Am. Chem. Soc. 32, 1680 (1910)
143. E.C. Shorey, U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. 211 (1930)
144. E.C. Shorey und J.M. Martin, J. Am. Chem. Soc. 52, 4907 (1930)
145. Soils & Fertilizers 8, 1 (1945)
146. U. Solms, Chimia 5, 45 (1951)
147. W.S. Souci, "Die Chemie des Moores". Stuttgart, 1938, S. 42
148. F.J. Sowden, Soil Sci. 82, 491 (1956)
149. F.J. Sowden, D.J. Parker und H.J. Atkinson, Sci. Agr. 32, 127 (1952)
150. U. Springer, Z. Pflanzenernähr., Düng. Bodenkd. 18, 129 (1940)
151. S.M. Stark, Anal. Chem. 22, 1158 (1950)
152. W. Stäubli, Diplomarbeit, E.T.H., Zürich, 1953
153. G. de Stevens und F. Nord, J. Am. Chem. Soc. 73, 4622 (1951)
154. F.J. Stevenson, I.D. Marks, J.E. Varner und W.P. Martin, Soil Sci. Soc.  
Amer., Proc. 16, 69 (1952)
155. F.J. Stevenson, Soil Sci. Soc. Amer., Proc. 18, 373 (1954)
156. M.L. Studebaker, E.W.D. Huffman, A.C. Wolfe und L.G. Nabors, Ind. Eng.  
Chem. 48, 162 (1956)
157. R.J. Swaby, J. Soil Sci. 1, 182 (1950)
158. H. Tanner und H. Rentschler, Die Fruchtsaftindustrie 1, 231 (1956)
159. O. Theander, Svensk Kem. Tidskr. 64, 197 (1952)
160. O. Theander, Acta Chem. Scand. 8, 989 (1954)
161. H. Thiele und H. Kettner, Kolloid- Z. 130, 131 (1953)
162. J. Tinsley, Reports 6<sup>th</sup> Intern. Congr. Soil Sci., Vol. B, 541 (1956)
163. M.V. Tracey, Biochem. J. 43, 185 (1948)
164. M.V. Tracey, Analyst 73, 554 (1948)
165. J.V. Tyurin, Trans. Dokuchaev Soil Inst. 23, 23 (1940); ref. (89)
166. J. Ubaldini, Brennstoff-Chem. 18, 273 (1937)
167. S.A. Waksman und K.R. Stevens, Soil Sci. 30, 97 (1930)
168. S.A. Waksman und H.W. Reuszer, Soil Sci. 33, 135 (1932)
169. S.A. Waksman, "Humus". Baltimore, 1936
170. F. Weber, Diss., E.T.H., Zürich, 1944
171. R.L. Whistler, Anal. Chem. 25, 1464 (1953)
172. R.L. Whistler und K.W. Kirby, J. Am. Chem. Soc. 78, 1755 (1956)
173. G. Zweifel, Diss., E.T.H., Zürich, 1956



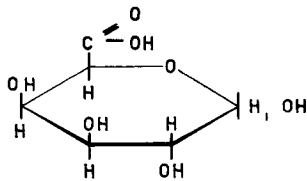
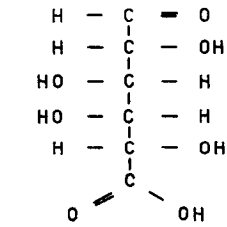
Acetylaceton



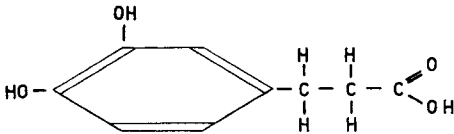
Furfural



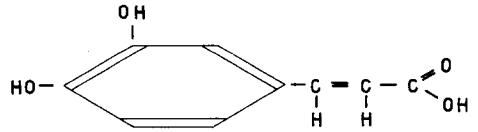
[D-] Galakturonsäure



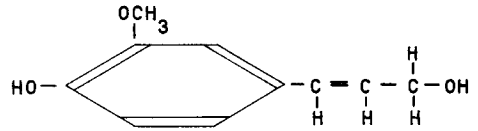
Hydrokaffeesäure



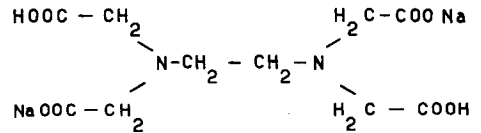
Kaffeesäure



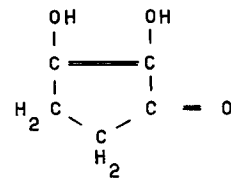
Koniferylalkohol



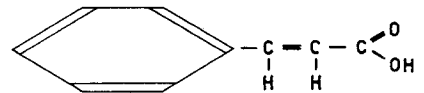
Komplexon III



Reduktinsäure



Zimtsäure



Am 20. Juli 1929 wurde ich, Peter Paul Dubach, in Wabern bei Bern als Sohn von Paul und Martha Dubach-Reber geboren. Ich besuchte in Koppligen die Primar- und Sekundarschule und trat 1943 ins Gymnasium Burgdorf über, wo ich im Herbst 1948 die Studien mit der Matura Typus C abschloss. Anschliessend folgte ein Jahr mit landwirtschaftlicher Praxis und Militärdienst. Im Herbst 1949 immatrikulierte ich mich an der Abteilung für Landwirtschaft der Eidgenössischen Technischen Hochschule und erwarb im Herbst 1953 das Diplom als Ingenieur Agronom. Dann begann ich im November 1953 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Deuel mit der vorliegenden Promotionsarbeit am Agrikulturchemischen Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule. Seit Sommer 1954 war ich auch als Assistent tätig.